



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**

**DETECCIÓN FOTOMÉTRICA DE RESIDUOS DE
ANTIMICROBIANOS EN LECHE MEDIANTE EL SISTEMA
MICROBIOLÓGICO RESCREEN®**

AUTOR: Med. Vet. María Laura Gasparotti

TESIS PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MASTER EN CIENCIAS VETERINARIAS
MENCIÓN PROTECCIÓN DE LOS ALIMENTOS

-Esperanza, febrero de 2011 -



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**

**DETECCIÓN FOTOMÉTRICA DE RESIDUOS DE
ANTIMICROBIANOS EN LECHE MEDIANTE EL SISTEMA
MICROBIOLÓGICO RESCREEN®**

AUTOR: Med. Vet. María Laura Gasparotti

DIRECTOR: Dr. Orlando Guillermo Nagel

CODIRECTOR: Dr. Rafael Lisandro Althaus

MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE TESIS

Dra. Ana Molina

Dra. Isabel Berruga

M.Sc. Diego Díaz

Esperanza, febrero de 2011

.....*A mi hija Lucila.*

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a Lucila por su amor, su paciencia, su entusiasmo, su inocente comprensión...

A mis Padres por su apoyo incondicional, sus consejos y por estar siempre junto a mí.

Deseo agradecer especialmente, al director de la tesis Dr. Orlando Nagel y al codirector Dr. Rafael Althaus, por sus enseñanzas, su confianza y su paciencia. Por brindarme sus conocimientos sin egoísmo, guiarme, alentarme y acompañarme en los momentos difíciles.

Al proyecto de investigación del programa CAI+D de la Universidad Nacional del Litoral "Sistema Microbiológico en microplacas (SMMP) para la detección e identificación de residuos de antibióticos en la leche" CAI+D'09- PN° 33-173, Res C.S. N° 100/09 del 29/05/2009, en cuyo marco se realizó el presente trabajo.

A la empresa RESSCREEN® por su valioso aporte, su apoyo y su confianza, para el desarrollo de esta investigación.

También quiero agradecer a la Dra. Raquel Pastor por sus enseñanzas, su paciencia y su amabilidad.

A mis verdaderos Amigos, por entenderme, acompañarme y ayudarme. Tan solo por estar, para escucharme o animarme.

Mi gratitud a aquellos compañeros que me alentaron a retomar este desafío y compartirlo con esfuerzo y alegría.

A mi querida Facultad de Ciencias Veterinarias.

Índice general

I. Introducción	1
II. Revisión Bibliográfica	4
II. 1. Los antimicrobianos en la Medicina Veterinaria.	4
II. 2. Clasificación de los Antibióticos.	6
II. 2. 1. Antibióticos Betalactámicos	6
II. 2. 1. 1. Estructuras de los betalactámicos	6
II. 2. 1. 2. Mecanismos de acción de los betalactámicos.	8
II. 2. 1. 3. Uso de los betalactámicos en la Medicina Veterinaria	8
II. 2. 1. 4. Inconvenientes que producen los betalactámicos	9
II. 2. 2. Antibióticos Aminoglucósidos	10
II. 2. 2. 1. Estructuras de los aminoglucósidos	10
II. 2. 2. 2. Mecanismos de acción de los aminoglucósidos	11
II. 2. 2. 3. Uso de los aminoglucósidos en la Medicina Veterinaria.	12
II. 2. 2. 4. Inconvenientes que producen los aminoglucósidos	13
II. 2. 3. Antibióticos Macrólidos.	13
II. 2. 3. 1. Estructuras de los macrólidos	13
II. 2. 3. 2. Mecanismos de acción de los macrólidos	15
II. 2. 3. 3. Uso de los macrólidos en la Medicina Veterinaria.	15
II. 2. 3. 4. Inconvenientes que producen los macrólidos	16
II. 2. 4. Antibióticos Lincosamidas.	17
II. 2. 4. 1. Estructuras de las lincosamidas.	17
II. 2. 4. 2. Mecanismos de acción de las lincosamidas.	17
II. 2. 4. 3. Uso de las lincosamidas en la Medicina Veterinaria.	18
II. 2. 4. 4. Inconvenientes que producen las lincosamidas.	18
II. 2. 5. Antibióticos Quinolonas.	18
II. 2. 5. 1. Estructuras y clasificación de las quinolonas.	19
II. 2. 5. 2. Mecanismos de acción de las quinolonas.	20
II. 2. 5. 3. Uso de las quinolonas en la Medicina Veterinaria.	21
II. 2. 5. 4. Inconvenientes que producen las quinolonas.	21
II. 2. 6. Antibióticos Sulfamidas.	22
II. 2. 6. 1. Estructuras de las sulfamidas.	22
II. 2. 6. 2. Mecanismos de acción de las sulfamidas.	23
II. 2. 6. 3. Uso de las sulfamidas en la Medicina Veterinaria.	23

II. 2. 6. 4. Inconvenientes que producen las sulfamidas.	24
II. 2. 7. Antibióticos Tetraciclinas.	24
II. 2. 7. 1. Estructuras y clasificación de las tetraciclinas.	25
II. 2. 7. 2. Mecanismos de acción de las tetraciclinas.	26
II. 2. 7. 3. Uso de las tetraciclinas en la Medicina Veterinaria.	27
II. 2. 7. 4. Inconvenientes que producen las tetraciclinas.	28
II. 3. Aspectos Legales.	28
II. 3. 1. Límite Máximo de Residuos.	29
II. 3. 2. Reglamentación en la Argentina.	31
II. 4. Métodos de screening para el control de antibióticos en la leche.	33
II. 4. 1. Propiedades de los Métodos Cualitativos.	34
II. 4. 1. 1. Selectividad de los métodos de screening.	35
II.4.1.1.1. Resultados anómalos o falsos positivos de los métodos de screening.	37
II. 4. 1. 2. Sensibilidad de los métodos de screening.	39
II. 4. 1. 2. 1. Resultados falsos violativos en los métodos de screening.	42
II. 4. 1. 3. Reproducibilidad de los métodos de screening: Estudios de validación colaborativa.	44
II. 4. 1. 4. Estudios de robustez interna y externa de los métodos de screening.	46
II. 4. 1. 5. Capacidad de detección de los métodos de screening.	48
II. 4. 1. 5. 1. Empleo de un lector fotométrico para la interpretación de los resultados.	51
III. Objetivos.	54
IV. Materiales y Métodos.	55
IV. 1. Materiales.	55
IV. 2. Sistema microbiológico ResScreen®.	55
IV. 3. Disoluciones de Fármacos y muestras fortificadas.	57
IV. 4. Curvas dosis- respuestas de los antimicrobianos.	59
IV. 5. Análisis estadísticos de los resultados.	59
IV. 5. 1. Determinación del <i>cut off</i> de los Bioensayos BT y BS.	59
IV.5.2. Modelización de las curvas dosis-respuestas.	63
IV.5.3. Cálculo de las capacidades de detección de los bioensayos BT y BS.	64
V. Resultados y discusión.	66
V.1. Determinación del <i>Cut Off</i> para los bioensayos BT Y BS.	66
V.1.1. Estudios de las densidades ópticas de los Bioensayos BT y BS.	66

V.1.2. Efecto de las densidades ópticas sobre las especificidades y sensibilidades de los Bioensayos BT y BS.	68
V.1.3. Análisis de las curvas ROC para los Bioensayos BT y BS.	69
V.1.4. Cálculo de las densidades ópticas relativas de corte para cada antibiótico mediante los bioensayos BT y BS.	71
V. 2. Estudios de capacidades de detección del sistema microbiológico ResScreen®.	73
V. 2. 1. Capacidad de detección del Bioensayo BT.	73
V.2.1.1. Capacidades de detección de antibióticos betalactámicos con Bioensayo BT.	73
V.2.1.2. Capacidades de detección de tetraciclinas con Bioensayo BT.	79
V.2.1.3. Capacidades de detección de sulfamidas con Bioensayo BT.	82
V.2.1.4. Capacidades de detección de otros antimicrobianos con Bioensayo BT.	84
V.2.2. Capacidad de detección del Bioensayo BS.	91
V.2.2.1. Capacidades de detección de antibióticos betalactámicos con Bioensayo BS.	91
V.2.2.2. Capacidades de detección de tetraciclinas con Bioensayo BS.	95
V.2.2.3. Capacidades de detección de sulfamidas con Bioensayo BS.	97
V.2.2.4. Capacidades de detección de otros antimicrobianos con Bioensayo BS.	99
VI. Conclusiones.	104
VII. Bibliografía.	106

Índice de Tablas

Tabla II.1	Clasificación de los antibióticos betalactámicos según su estructura.	7
Tabla II.2	Clasificación de los aminoglucósidos según su composición química.	11
Tabla II.3	Clasificación de los macrólidos según su estructura y procedencia.	14
Tabla II.4	Clasificación de las quinolonas según su estructura.	19
Tabla II.5	Clasificación de las tetraciclinas según su evolución en la elaboración.	25
Tabla II.6	Límites máximos de residuos (LMRs) establecidos por el Codex Alimentarius, Unión Europea y niveles de tolerancia en USA de antimicrobianos en leche.	31
Tabla II.7	Propiedades a evaluar para la validación de diferentes métodos analíticos.	34
Tabla II.8	Selectividad de diferentes métodos de screening utilizados para la detección de residuos de antibióticos en leche.	36
Tabla II.9	Interferencias con los métodos de detección de inhibidores.	38
Tabla II.10	Sensibilidades de los principales métodos de inhibición microbiológica suministrados por los fabricantes de los métodos rápidos.	41
Tabla II.11	Resultados del estudio de validación colaborativa del sistema ResScreen®.	46
Tabla II.12	Capacidades de detección α ($\mu\text{g/l}$) de sustancias antimicrobianas suministradas por los fabricantes de los métodos microbiológicos.	51
Tabla II.13	Longitudes de onda utilizadas para las interpretaciones fotométricas de métodos microbiológicos para la detección de antibióticos en leche.	52
Tabla II.14	Capacidades de detección de antibióticos betalactámicos en leche para diferentes lecturas del método BRT® AiM.	53
Tabla IV.1	Interpretación de los resultados mediante la aplicación simultánea de los bioensayos BT y BS.	56
Tabla IV.2	Antibióticos utilizados en el diseño y validación de los bioensayos.	58

Tabla IV.3	Concentraciones de antimicrobianos utilizadas para determinar las capacidades de detección del sistema ResScreen®	60
Tabla V.1	Parámetros estadísticos de las densidades ópticas (550 nm) del sistema ResScreen®	66
Tabla V.2	Valores de especificidad y sensibilidad para diferentes valores de <i>Cut Off</i> para el sistema ResScreen®	71
Tabla V.3	Densidades ópticas relativas de corte para los Bioensayos BT y BS.	72
Tabla V.4	Coeficientes del modelo de regresión logística para las curvas dosis respuestas de las absorbancias relativas porcentuales del Bioensayo BT utilizado con penicilinas en leche.	73
Tabla V.5	Capacidades de detección de antibióticos betalactámicos en leche mediante el Bioensayo BT.	76
Tabla V.6	Coeficientes del modelo de regresión logística para las curvas dosis respuestas de las absorbancias relativas porcentuales del Bioensayo BT utilizado con tetraciclinas en leche.	79
Tabla V.7	Capacidades de detección de antibióticos tetraciclinas en leche mediante el Bioensayo BT.	81
Tabla V.8	Coeficientes del modelo de regresión logística para las curvas dosis respuestas de las absorbancias relativas porcentuales del Bioensayo BT utilizado con sulfamidas en leche.	82
Tabla V.9	Capacidades de detección de sulfamidas en leche mediante el Bioensayo BT.	83
Tabla V.10	Coeficientes del modelo de regresión logística para las curvas dosis respuestas de las absorbancias relativas porcentuales del Bioensayo BT utilizado con otros agentes antimicrobianos en leche.	85
Tabla V.11	Capacidades de detección de otros antimicrobianos en leche mediante el bioensayo BT.	88
Tabla V.12	Coeficientes del modelo de regresión logística para las curvas dosis respuestas de las absorbancias relativas porcentuales del Bioensayo BS utilizado con penicilinas en leche.	91
Tabla V.13	Capacidades de detección de antibióticos betalactámicos en leche	93

	mediante el bioensayo BS.	
Tabla V.14	Coeficientes del modelo de regresión logística para las curvas dosis respuestas de las absorbancias relativas porcentuales del Bioensayo BS utilizado con tetraciclinas en leche.	95
Tabla V.15	Capacidades de detección de tetraciclinas en leche mediante el bioensayo BS.	96
Tabla V.16	Coeficientes del modelo de regresión logística para las curvas dosis respuestas de las absorbancias relativas porcentuales del Bioensayo BS utilizado con sulfamidas en leche.	97
Tabla V.17	Capacidades de detección de sulfamidas en leche mediante el Bioensayo BS.	99
Tabla V.18	Coeficientes del modelo de regresión logística para las curvas dosis respuestas de las calificaciones visuales y fotométricas del bioensayo BS utilizado con otros antimicrobianos en leche.	100
Tabla V.19	Capacidad de detección de otros antimicrobianos en leche mediante el Bioensayo BS.	103

Índice de Figuras

Figura II.1	Estructura básica de las sulfamidas.	22
Figura II.2	Estructura química del núcleo común de las tetraciclinas.	26
Figura IV.1	Errores α y β que se comenten cuando se elige un valor de <i>Cut Off</i> para diferenciar las muestras positivas y negativas.	62
Figura IV.2	Curva ROC para un método de screening.	63
Figura V.1	Frecuencias absolutas en función de las densidades ópticas para las calificaciones positivas y negativas del Bioensayo BT.	67
Figura V.2	Frecuencias absolutas en función de las densidades ópticas para las calificaciones positivas y negativas del Bioensayo BS.	67
Figura V.3	Efecto de la densidad óptica sobre la especificidad, sensibilidad y media aritmética de ambas propiedades para el Bioensayo BT.	68
Figura V.4	Efecto de la densidad óptica sobre la especificidad, sensibilidad y media aritmética de ambas propiedades para el Bioensayo BS.	69
Figura V.5	Curva ROC para el Bioensayo BT.	70
Figura V.6	Curva ROC para el Bioensayo BS.	70
Figura V.7	Curvas dosis respuestas de penicilinas en leche analizadas por el Bioensayo BT.	74
Figura V.8	Curvas dosis respuestas de cefalosporinas de leche analizadas por el Bioensayo BT.	75
Figura V.9	Curvas dosis respuestas de tetraciclinas en leche analizadas por el Bioensayo BT.	80
Figura V.10	Curvas dosis respuestas de sulfamidas en leche analizadas por el Bioensayo BT.	83
Figura V.11	Curvas dosis respuestas de aminoglucósidos en leche analizadas por el Bioensayo BT.	86
Figura V.12	Curvas dosis respuestas de macrólidos en leche analizadas por el Bioensayo BT.	87
Figura V.13	Curvas dosis respuestas de quinolonas en leche analizadas por el Bioensayo BT.	87
Figura V.14	Curvas dosis respuestas de penicilinas en leche analizadas por el Bioensayo BS.	92
Figura V.15	Curvas dosis respuestas de cefalosporinas de leche analizadas por el Bioensayo BS.	93
Figura V.16	Curvas dosis respuestas de tetraciclinas de leche analizadas por el Bioensayo BS.	96
Figura V.17	Curvas dosis respuestas de sulfamidas en leche analizadas por el Bioensayo BS.	98
Figura V.18	Curvas dosis respuestas de aminoglucósidos en leche analizadas	

	por el Bioensayo BS.	101
Figura V.19	Curvas dosis respuestas de macrólidos en leche analizadas por el Bioensayo BS.	101
Figura V.20	Curvas dosis respuestas de quinolonas en leche analizadas por el Bioensayo BS.	102

RESUMEN

Para evitar los efectos perjudiciales que producen los residuos de antibióticos sobre la salud del consumidor y la industria láctea, se utilizan métodos de inhibición microbiológica. El sistema microbiológico ResScreen[®] permite detectar e identificar en forma específica antibióticos betalactámicos, tetraciclinas y sulfonamidas en un tiempo de 4 horas, mediante la utilización simultánea de los bioensayos BT (púrpura) y BS (negro). El objetivo del presente trabajo fue implementar un lector fotométrico para el análisis de los resultados del método ResScreen[®] y evitar las apreciaciones subjetivas de las interpretaciones visuales. Se establecieron los puntos de corte (cut off) para ambos bioensayos mediante el uso de las curvas ROC. Los valores de cut off fueron de 0.84, y 0.86 unidades de densidades ópticas para los bioensayos BT (especificidad 0.944, sensibilidad 0.942) y BS (especificidad 0.971, sensibilidad 0.968), respectivamente. El criterio para calcular los límites de detección resultaron similares al 45% establecidos por comúnmente para otros métodos de screening (49% para bioensayo BT y 48% para bioensayo BS). El bioensayo BT permite detectar residuos de amoxicilina, ampicilina, cloxacilina, oxacilina, penicilina "G", cefalexina, cefoperazone, ceftiofur[®], clortetraciclina, oxitetraciclina, tetraciclina, neomicina, lincomicina y tilosina a niveles cercanos a los LMRs, en tanto que bioensayo BS detecta amoxicilina, ampicilina, cloxacilina, oxacilina, penicilina "G", cefalexina, cefoperazone, ceftiofur[®], sulfadiazina, sulfadimetoxina, sulfametazina, sulfametoxazol, sulfatiazol, neomicina, lincomicina y tilosina a niveles similares a sus LMRs.

PALABRAS CLAVES: residuos antimicrobianos, sistemas microbiológicos, lectura fotométrica, puntos de corte.

SUMMARY

The microbial inhibition methods are used to avoid the detrimental effects that antibiotic residues produce on consumer health and the dairy industry. The microbiological system ResScreen ® can detect and identify beta-lactam antibiotics, tetracyclines and sulfonamides in 4 hours, using simultaneously the bioassays BT (purple) and BS (black). The aim of this study was to implement a photometric reader to analysis the results of the method ResScreen ® and avoid the subjective perception of visual interpretations. It were established cut offs points for both bioassays using ROC curves. The cut off values were 0.84, and 0.86 OD units for bioassays BT (specificity 0.944, sensitivity 0.942) and BS (0.971 specificity, sensitivity 0.968), respectively. The criteria for calculating the limits of detection were close to the 45% established for other screening methods (49% for BT bioassay and 48% for bioassay BS). The bioassay BT can detect residues of amoxicillin, ampicillin, cloxacillin, oxacillin, penicillin "G", cephalixin, cefoperazone, ceftiofur ®, chlortetracycline, oxytetracycline, tetracycline, neomycin, lincomycin and tylosin at levels close to the MRLs. The bioassay BS can detect amoxicillin, ampicillin, cloxacillin, oxacillin, penicillin "G", cephalixin, cefoperazone, ceftiofur ®, sulfadiazine, sulfadimethoxine, sulfamethazine, sulfamethoxazole, sulfathiazole, neomycin, lincomycin and tylosin at levels similar to their MRLs.

Key Words: antimicrobial residues, microbiological systems, photometric reading, cut offs.

I. INTRODUCCIÓN

Los residuos de diversos antibióticos en la leche constituye un riesgo potencial para la salud del consumidor, ya que estos residuos pueden ser tóxicos y peligrosos para la salud humana y causar potencialmente resistencia a los antimicrobianos (Demoly y Romano, 2005; Wilke *et al.*, 2005). Además, los residuos ocasionan problemas de tipo tecnológico, asociados a la fabricación de productos lácteos fermentados, como el queso y el yogurt (Packham *et al.*, 2001; Berruga *et al.*, 2007; Bradley y Green, 2009).

La Unión Europea (UE) ha definido los Límites Máximos de Residuos (LMRs) para antibióticos de uso veterinario en leche. Estos residuos, fueron establecidos por la Comisión Reguladora CEE 2377/90 (CEE, 1990), CEE 675/92 (CEE, 1992a) y CEE 3093/92 (CEE, 1992b). En forma periódica, se realizan recomendaciones y modificaciones para ampliar la lista de compuestos con LMRs.

La Directiva CEE 23/96 (CEE, 1996) hace referencia a las medidas de control aplicadas a ciertas sustancias y sus residuos en animales en producción y sus productos derivados, entre los cuales se destaca la leche.

Recientemente, Unión Europea a través de su Directiva CEE 657/2002 (CEE, 2002) clasifica los métodos analíticos para la detección de sustancias inhibidoras en leche en dos grupos: métodos de tipo cualitativo (que brindan una respuesta de tipo dicotómica) y los métodos cuantitativos (entre los cuales se destacan las técnicas cromatográficas como HPLC-MS-MS, HPLC-DAD, etc.).

Dentro las técnicas cualitativas se destacan los métodos de inhibición microbiológica, por ser rápidos, económicos y precisos. Por ello, numerosas empresas comerciales han desarrollado diversos métodos microbiológicos para la detección de residuos de antibióticos en la leche (Diserens *et al.*, 2005; Toldra y Reig, 2006). Estos test se basan en la inhibición del crecimiento de una bacteria-test, entre las cuales se destaca

Geobacillus stearothermophilus subsp. *calidolactis* utilizada en los métodos Delvotest[®] (Kelly, 1982), BRT[®] AiM (Müller y Jones, 1993), Eclipse[®] (Zeu-Inmunotec, 2003), Charm[®] AIM-96 (Zomer y Lieu, 1995).

Dichos métodos pueden detectar la simple “presencia” o “ausencia” de residuos de antibióticos en la leche de una manera no específica. Sin embargo para identificar compuestos betalactámicos o sulfamidas, se necesita realizar ensayos posteriores como las determinaciones de la penicilinasa y del ácido para-aminobenzoico (PABA). De este modo, los residuos de antibióticos pueden clasificarse en betalactámicos o sulfamidas (Botsoglou y Fletouris, 2001).

Estas pruebas no resultan suficientes para identificar otros agentes antimicrobianos, tales como las tetraciclinas. Así, por ejemplo, Yamaki *et al.* (2004) revela que de un total de 2686 muestras de leche de oveja, solamente 47 fueron positivas al método de inhibición microbiológica Delvotest[®] "SP". Cuando emplean como técnica de identificación los ensayos de la penicilinasa y la PABA, solamente logran identificar un 29,8% de los residuos como pertenecientes a los antibióticos betalactámicos. Por el contrario, un porcentaje muy elevado de residuos (70,2%) no llegan a ser identificados. Estos autores sugieren que esta metodología es insuficiente para una identificación más completa de residuos de antibióticos en la leche.

Con el propósito de incrementar el número de agentes antimicrobianos a identificar, Althaus y Nagel (2006) proponen la implementación del sistema microbiológico ResScreen[®], que cumple con las directrices de International Standardization Organization (2006) y además, permite la identificación de los residuos de antibióticos en la leche de tres familias: betalactámicos, tetraciclinas y sulfamidas.

Este sistema microbiológico consiste en el uso simultáneo de dos métodos: bioensayo "BT" (betalactámicos y tetraciclinas) y bioensayo "BS" (betalactámicos y sulfamidas). Ambos test, contienen esporas de *G. stearothermophilus* subsp. *calidolactis*,

medio de cultivo, indicadores (ácido-base y redox) y agentes que mejoran la sensibilidad de las tetraciclinas (Nagel *et al.*, 2009a) y las sulfamidas (Nagel, 2009).

Las propiedades que deben evaluarse en los métodos de screening son: selectividad, sensibilidad, especificidad cruzada y capacidad de detección α de agentes antimicrobianos, por tratarse de metodologías cualitativas (Pickemaat, 2009).

La capacidad de detección α ($CD\alpha$) para cada agente antimicrobiano merece una especial atención, ya que se trata de la capacidad que posee un método para producir un cambio en la respuesta visual. Por ello, cuando la capacidad de detección de un antibiótico es similar al LMR establecido por la legislación, el método de screening constituye un instrumento seguro y fiable para el control de residuos en la leche, evitando que la leche con residuos se incorpore a la cadena alimentaria.

Debido a las diferencias subjetivas que se pueden presentar en las interpretaciones visuales de los resultados, y con el propósito de efectuar lecturas de una manera más objetiva y automatizada, algunos autores (Schiffmann *et al.*, 1992; Luitz y Suhren, 1995a,b; Luitz *et al.*, 1996; Althaus *et al.*, 2003) proponen la implementación de un lector fotométrico de placas de microtitulación.

Por ello, el uso de un lector fotométrico para el análisis de los resultados del sistema microbiológico ResScreen[®] constituye una alternativa interesante, tanto en el estudio de los límites de detección a través de la curva dosis-respuesta, como en la determinación de los puntos de cortes (*cut off*) de ambos bioensayos para decidir el destino de la leche que recibe una industria láctea.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II. 1. Los antimicrobianos en la medicina veterinaria

La utilización de sustancias antimicrobianas en la medicina veterinaria representa una práctica ampliamente utilizada en todas sus especialidades, tales como bovina, aviar, porcina e incluso en animales de deporte y de compañía (McEwen *et al.*, 1991). El término antimicrobiano incluye a los antibióticos producidos por diferentes cepas de microorganismos (bacterias, hongos, actinomicetos) y aquellos antiinfecciosos que se obtienen por síntesis (Young, 1994; Cordiés Jackson *et al.*, 1998).

En general, se caracterizan por inhibir el crecimiento de otros microorganismos y eventualmente poder destruirlos. Estos compuestos difieren en sus propiedades físicas, químicas y farmacológicas, así como en su mecanismo de acción y espectro antimicrobiano (Bowman y Raud, 1987; Calderwood y Moerelling, 1990; Jewetz, 1989).

En el ganado bovino, se utilizan para controlar y prevenir enfermedades, además de emplearse como promotores del crecimiento (Hays, 1986; Sawant *et al.*, 2005). En el caso específico del ganado vacuno productor de leche, los antimicrobianos merecen una especial atención, puesto que pueden eliminarse en forma total o parcial como residuos en la leche (Allison, 1985).

Los problemas que pueden ocasionar estos residuos se han planteado desde hace varias décadas, por ejemplo, Doan (1956) menciona los posibles riesgos que ocasiona la presencia de antibióticos en la leche, basado en numerosas publicaciones preferentemente sobre los residuos de penicilinas (Welch *et al.*, 1955; Jester *et al.*, 1959), y los efectos que produce en los procesos en la industria láctea (Hunter, 1949; Bryan, 1951; Thomas *et al.*, 1956).

En efecto, la presencia de residuos de diversos antibióticos en la leche constituye un riesgo potencial para la salud del consumidor, porque pueden ser tóxicos, peligrosos y

causar potencialmente resistencia a los antimicrobianos (Doan, 1956; Khan *et al.*, 2000; Demoly y Romano, 2005; Wilke *et al.*, 2005). Actualmente, los consumidores manifiestan una gran preocupación por la seguridad de sus alimentos y demandan buenas prácticas en su producción (Ruegg, 2003).

Además, los residuos ocasionan problemas de tipo tecnológico, asociados a la fabricación de productos lácteos fermentados, como el queso y el yogurt (Hunter, 1949; Packham *et al.*, 2001; Berruga *et al.*, 2007; Bradley y Green, 2009). Estos problemas han despertado el interés de los industriales y productores por obtener leche con buena calidad alimentaria (Payne *et al.*, 1999).

Según Bishop *et al.* (1984), los antimicrobianos se administran en el ganado vacuno por cuatro métodos diferentes:

- a. Infusión dentro de la ubre en el tratamiento de las mastitis,
- b. inyección (intramuscular, endovenosa o subcutánea) para el tratamiento de numerosas enfermedades,
- c. administración oral para el tratamiento de enfermedades o como suplemento dietario
- d. aplicación tipo “flush” reproductivo para infecciones uterinas, cervicales o vaginales.

Desde el punto de vista de los residuos en la leche, la administración oral, intramuscular y intravenosa ocasionan menos problemas que la aplicación por vía intramamaria (Zwald *et al.*, 2004). Esta última es la más usada para el tratamiento de la mastitis, y depende de la cantidad de antibiótico administrado, el tipo de preparado, la dosis, los intervalos y el número de ordeño, la producción de leche y otros factores individuales (Ziv, G., 1974; Sawant *et al.*, 2005). Además, debe considerarse que la mastitis es la causa más frecuente de utilización de antibióticos de las vacas en lactancia (Meek *et al.*, 1986; Gardner *et al.*, 1990; Mitchell *et al.*, 1998)

Los residuos generados por los diversos tratamientos, pueden persistir durante un mayor o menor tiempo en los animales tratados, dependiendo de la composición intrínseca de la molécula, los excipientes, la dosis y la vía de administración de los mismos (Seymour *et al.*, 1988a; Bevil, 1989; Debackere, 1995).

Por ello y debido a la importancia que revisten los antibióticos en el tratamiento del ganado vacuno productor de leche, se procederá a detallar cada una de las familias de estos compuestos, así como también los principales usos en veterinaria, sus mecanismos de acción-eliminación y los inconvenientes que ocasionan tanto para la salud del consumidor, como para las empresas lácteas.

II.2. Clasificación de los antibióticos

Se han utilizado diferentes criterios para agrupar los antibióticos, aunque el más difundido contempla al núcleo central de su estructura química, puesto que cada familia comparte rasgos comunes como el mecanismo de acción, toxicidad y espectro antibacteriano (Giménez Doménech *et al.*, 2002). Por ello, se realizará una descripción de las principales familias de antimicrobianos, clasificadas según su estructura química.

II.2.1. Antibióticos betalactámicos

El uso de estas moléculas comenzó en 1941 a partir de la administración de penicilina a un paciente con sepsis estafilocócica. Desde entonces, son los antimicrobianos más prescritos en atención primaria y hospitales (Marín y Gudiol, 2003).

II.2.1.1. Estructuras de los betalactámicos: Las penicilinas y las cefalosporinas son sustancias similares en sus estructuras y mecanismos de acción, aunque difieren en su espectro antibacteriano y su farmacocinética. La presencia del anillo betalactámico define

químicamente a esta familia y da lugar a grupos tales como penicilinas, cefalosporinas, carbapenemas, monobactamas e inhibidores de betalactamasas (Tabla II.1).

Tabla II.1. Clasificación de los antibióticos betalactámicos según su estructura

Betalactámico	Grupos	Antimicrobianos
Penicilinas	Naturales Aminopenicilinas Resistentes a β -lactamasas Amplio espectro	Penicilina G, penicilina V Amoxicilina, ampicilina Oxacilina, cloxacilina, dicloxaciclina, nafacilina Ticarcilina, carbencilina
Cefalosporinas	Primera generación Segunda generación Tercera generación Cuarta generación	Cefalotina cefapirina, cefalexina, cefadroxil, Cefuroxima, ceforanida, cefamandol, cefoxitina Ceftiofur, ceftriaxona, cefotaxima, cefoperazona Cefepima, cefquinoma
Otros	Carbapemas Monobactámicos Acido Clavulánico	Imipenem Aztreonam

Las penicilinas son un grupo de antibióticos que contienen un anillo betalactámico y un anillo de tiazolidina, formando el ácido 6-aminopenicilánico, que se obtiene por la condensación de una molécula de valina y una de cisteína, para dar lugar a un doble anillo característico. Además, presentan una cadena lateral en la posición 6 del anillo que varía en las diferentes penicilinas, siendo esta cadena responsable de sus propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas.

Las estructuras de las cefalosporinas son similares a las penicilinas y su núcleo está formado por un anillo dihidrotiacínico (en lugar del anillo tiazolidínico de las penicilinas) y un anillo betalactámico. La introducción de modificaciones en las cadenas laterales origina diferentes tipos de cefalosporinas.

El ácido clavulánico tiene un núcleo similar al ácido penicilánico, con la sustitución del átomo de azufre de la posición 3 por un átomo de oxígeno, que incrementa la reactividad de la molécula y proporciona una afinidad mayor por las betalactamasas.

Actualmente las penicilinas y las cefalosporinas son los antibióticos más utilizados. Además en los últimos años se ha avanzado en el desarrollo de nuevas moléculas, tales como las carbapemas y los monobactámicos (Abraham, 1987).

La estructura básica de las carbapemas contiene un anillo betalactámico fusionado a un anillo pirrolidínico, compartiendo un átomo de nitrógeno. Estas modificaciones proporcionan una mayor afinidad por las proteínas fijadoras de penicilina diana (PBP), representando un incremento en su potencia, espectro antibacteriano y resistencia a las betalactamasas. Por su parte, los monobactámicos son derivados del ácido 3-aminomonobactámico (3-AMA) y tienen una estructura betalactámica sencilla (monocíclica) donde el anillo betalactámico no está fusionado a otro secundario.

II.2.1.2. Mecanismo de acción de los betalactámicos: El rol principal de los antibióticos betalactámicos es impedir la formación de la pared de la célula bacteriana, inhibiendo la actividad de las transpeptidasas, enzimas que catalizan la formación de los enlaces peptídicos cruzados en la fase de unión de los polímeros de glucopéptido de la pared celular (Neu, 1987; Thompson, 1987; Wright y Wilkoushe, 1987; Marín y Gudiol, 2003).

Las bacterias gram positivas y gram negativas presentan diferente sensibilidad a los antibióticos betalactámicos, dependiendo de sus sitios receptores y de la cantidad relativa de peptidoglucano de su pared celular, siendo mayor en las bacterias gram positivas que en las gram negativas (Marín y Gudiol, 2003).

II.2.1.3. Uso de los betalactámicos en medicina veterinaria: Se trata de un grupo de antibióticos ampliamente utilizados para el tratamiento de la mastitis, enfermedad que presenta elevada prevalencia en el ganado lechero (Honkanen-Buzalski y Reybroeck, 1995). Además, se utilizan contra las enfermedades respiratorias, genitourinarias, podales y del aparato digestivo (Rubio y Boggio, 2009).

En veterinaria, se emplean a niveles terapéuticos para prevenir infecciones, por ejemplo durante el tratamiento del secado de las glándulas mamarias del ganado lechero. También, se utilizan a niveles subterapéuticos para incrementar la eficiencia alimentaria, promover el crecimiento y prevenir enfermedades (Khaskheli *et al.*, 2008).

El espectro de acción de estos antibióticos se amplió mediante la incorporación de nuevas moléculas con mayor actividad frente a bacilos gram negativos. Sin embargo, la progresiva aparición de resistencias adquiridas ha limitado su uso empírico y su eficacia (Pelczar, 1986; Jones y Seymour, 1988).

Actualmente, la penicilina es el antibiótico preferido para el tratamiento de un gran número de infecciones clásicas, las cefalosporinas se emplean en la profilaxis quirúrgica e infecciones comunitarias graves, mientras que las carbapenemas se utilizan en infecciones mixtas y enfermedades ocasionadas por bacterias multirresistentes (Marín y Gudiol, 2003).

II.2.1.4. Inconvenientes que producen los betalactámicos: Según Lyn (1992), los residuos de betalactámicos en los alimentos ocasionan inconvenientes debido a su estructura química, tales como reacciones de hipersensibilidad (exantemas, edemas, hemólisis, hemocitopenias y excepcionalmente accidentes graves como el shock anafiláctico). Estos cuadros pueden presentarse con frecuencias del 5% al 10% de la población, que es extremadamente sensible a dosis de 1 µg/l de penicilina u otros betalactámicos (Khaskheli *et al.*, 2008). Además, Marín y Gudiol (2003) señalan hipersensibilidad cruzada entre los betalactámicos (penicilinas con carbapenemas y penicilinas con cefalosporinas).

Los efectos adversos de la administración oral o parenteral directa, son poco frecuentes y generalmente de escasa importancia clínica, ya que estos fármacos actúan sobre sustratos enzimáticos que no están presentes en las células eucariotas del hombre

y de los animales. Poseen una cierta acción irritativa directa sobre el aparato digestivo y sobre el músculo o la vena, dependiendo de la vía de administración, pudiendo causar flebitis o miositis (Marín y Gudiol, 2003).

Desde el punto de vista tecnológico, los betalactámicos pueden interferir en la fabricación de productos lácteos fermentados. Así, 1 µg/l de penicilina retrasa la actividad del starter en la fabricación de yogur. Además, los antimicrobianos también disminuyen la formación de ácido durante el cuajado de la leche en la producción de quesos, alterando su maduración y flavor (Jones, 1999).

II. 2. 2. Antibióticos aminoglucósidos

El descubrimiento de la estreptomicina en 1944 por Waksman, a partir de cultivos de *Streptomyces griseus*, constituyó un avance médico importante en el campo de los antibióticos, fundamentalmente por su actividad antituberculosa (Waksman, 1946; Mackaness, 1952). Desde entonces se obtuvieron numerosos compuestos de esta familia, ya sea de origen natural (kanamicina, gentamicina y tobramicina) o por modificaciones químicas (dibekacina, amikacina, netilmicina y arbekacina), tendientes a mejorar sus propiedades farmacocinéticas, toxicológicas y/o microbiológicas (Mingeot-Leclercq *et al.*, 1999, Palomino y Pachón, 2003).

II.2.2.1. Estructuras de los aminoglucósidos: Desde el punto de vista químico, los aminoglucósidos son bases orgánicas polares, con similitudes en sus propiedades farmacocinéticas. Sus estructuras químicas contienen aminoazúcares unidos por enlaces glucosídicos a un alcohol cíclico hexagonal con un grupo amino (aminociclitol). Por lo tanto, su denominación química es “aminoglucósidos aminociclitales” (Palomino y Pachón, 2003), aunque en la práctica se utiliza sólo el primer nombre.

Los aminoglucósidos se clasifican en dos grandes grupos, según la estructura del componente aminociclitol, estreptidina o desoxiestreptamina (Pancoast, 1988; Gilbert, 2000), tal como se observa en la Tabla II.2.

Tabla II.2. Clasificación de los aminoglucósidos según su composición química

Aminoglucósidos	Grupos	Ejemplos
	Aminociclitol estreptidina	Estreptomina
	Aminociclitol desoxiestreptamina	
Aminoglucósidos con aminociclitol	Disustituidos 4,6 Familia Kanamicina	Kanamicina, Amikacina
	Familia Gentamicina	Tobramicina, Dibekacina Gentamicina, Sisomicina
	Disustituidos 4,5	Netilmicina, Isepamicina Neomicina, Paromomicina
Aminociclitol sin aminoglucósido		Espectinomicina

El primero de estos grupos incluye a la estreptomina, el segundo grupo es más amplio e involucra a la mayoría de las moléculas utilizadas en la práctica clínica actual. Un compuesto peculiar es la espectinomicina, cuya estructura está compuesta por aminociclitol sin componente aminoglucósido (Pancoast, 1988; Mingeot-Leclercq *et al.*, 1999; Gilbert, 2000).

Los aminoglucósidos son sustancias de carácter básico, con un peso molecular comprendido entre 445 y 600 Dalton. Su actividad antimicrobiana se inhibe por un pH ácido y por cationes divalentes. Por ello, no presentan buena acción antimicrobiana en las secreciones bronquiales, abscesos, necrosis tisular y grandes cantidades de detritos orgánicos (Pancoast, 1988; Palomino y Pachón, 2003).

II.2.2.2. Mecanismo de acción de los aminoglucósidos: Se trata de moléculas bactericidas con un mecanismo de acción que comprende una interacción inicial con la superficie externa de la membrana celular bacteriana, el transporte a través de la membrana interna y finalmente, la unión a la subunidad “30S” de los ribosomas, que

inhibe la síntesis de proteínas, conduciendo a la muerte del microorganismo (Davis, 1987; Edson y Terrel, 1999; Mingeot-Leclercq *et al.*, 1999; Kotra *et al.*, 2000).

Estos antibióticos muestran actividad bactericida frente a bacilos gram negativos aerobios del género Enterobacteriaceae y bacilos no fermentadores como *Pseudomona aeruginosa* y *Acinetobacter* spp. También presentan cierta acción frente a algunos micoplasmas y micobacterias.

La asociación con antimicrobianos que actúan sobre la pared bacteriana (penicilina, cefalosporina, monobactam, carbapenem, glucopéptido) muestra una actividad sinérgica frente a diversos microorganismos (Davis *et al.*, 1986; Wyka y St. John, 1990; Eliopoulos y Moerelling, 1996), por ello se emplea frecuentemente la asociación penicilina con estreptomicina.

II.2.2.3. Uso de los aminoglucósidos en medicina veterinaria: Se utilizan para el tratamiento de una gran variedad de infecciones entéricas, respiratorias y otras enfermedades causadas por gérmenes gram negativos, como colibacilosis y salmonelosis de terneros y cerdos (Adams, 2001).

En el ganado vacuno lechero, los aminoglucósidos (solos o en combinación con betalactámicos, tetraciclinas o macrólidos) se utilizan por vía intramamaria para el tratamiento de la mastitis, por vía intrauterina en caso de metritis y por vía parenteral para el tratamiento de procesos respiratorios (Botsoglou y Fletouris, 2001).

Por su carácter policatiónico, los aminoglucósidos son muy solubles en agua, estables en el medio ambiente y presentan una absorción gastrointestinal menor al 1% (Chambers y Sande, 1995; Gilbert, 2000; Mella *et al.*, 2004), por ello, deben administrarse por vía parenteral. Debido a que estos antibióticos se absorben rápidamente cuando se administran por vía intramuscular, se recomienda administrarlos mediante perfusión

lenta durante 15-30 min en caso de utilizar la vía intravenosa para evitar la aparición de bloqueo neuromuscular (Gilbert, 2000).

Debido a la elevada solubilidad en agua y limitada unión a las proteínas, el transporte de los aminoglucósidos desde la glándula mamaria a la leche es reducida (Phillips y Shannon, 1997, Davies, 1980, Mingeot-Leclercq *et al.*, 1999).

II.2.2.4. Inconvenientes que producen los aminoglucósidos: Como consecuencia de la alta solubilidad que presentan los aminoglucósidos y su reducido transporte a la glándula mamaria, su eliminación en leche proveniente de tratamientos parenterales es muy limitada (Gilbert, 2000). Sin embargo cuando se administran en forma intramamaria se pueden encontrar en altas concentraciones, motivo por el cual deben respetarse en forma estricta los tiempos de retirada sugeridos por los laboratorios (Ziv y Rasmussen, 1974).

II.2.3. Antibióticos macrólidos

Eritromicina, originalmente iloticina, es el macrólido más utilizado en la medicina veterinaria. Fue aislada de una cepa de *Streptomyces eruthraeus* proveniente de tierra recolectada en el archipiélago de Filipinas (McGuire, 1952). Inmediatamente se determinaron los límites de toxicidad y la eficacia del fármaco en infecciones experimentales causadas por cocos gram positivos (Kapusnik-Uner *et al.*, 1996).

Desde entonces, se han incorporado nuevos compuestos, con el objetivo de mejorar deficiencias farmacocinéticas, el perfil de interacción de la droga y la intolerancia gastrointestinal (McConnell, 1999), sin embargo, eritromicina se considera el antibiótico característico de esta familia (Giner Almaraz *et al.*, 1995; Sádaba y Azanza, 2005).

II.2.3.1. Estructuras de los macrólidos: Esta familia de antibióticos está constituida por un conjunto de compuestos estructuralmente emparentados, que se caracterizan por

poseer un anillo lactónico macrocíclico de 12 a 16 átomos de carbono, carecen de átomos de nitrógeno y presentan escasos o ningunos dobles enlaces (Bryskier *et al.*, 1993a; Renard, 1994; Horie, 1995; Merck & Co., 2000). El anillo de lactona se encuentra unido a desoxiazúcares aminados mediante enlaces glucosídicos (Sádaba y Azanza, 2005). La diferencia en la cantidad de átomos de carbono que posee cada anillo, marca la variabilidad que existe entre los macrólidos en cuanto a su actividad y características farmacocinéticas, químicas y biológicas (González-Piñera *et al.*, 1998; Shryock *et al.*, 1998; Mulazimoglu *et al.*, 2005). Por ello, Lucas *et al.* (2007) sugieren para estos compuestos la clasificación que se muestra en Tabla II.3.

Tabla II.3. Clasificación de los macrólidos según su estructura y procedencia

Característica del Anillo	Origen	Ejemplos
14 átomos de C	Naturales	Eritromicina, oleandomicina
	Semi-sintéticos	Roxitromicina, diritromicina, fluritromicina, Claritromicina, telitromicina
15 átomos de C	Semi-sintéticos	Azitromicina, tulatromicina
15 átomos de C	Naturales	Josemicina, espiramicina, kitasamicina, tilosina, midecamicina
	Semi-sintéticos	Rokitamicina, miocamicina, tilmicosina

Los macrólidos son bases débiles, lipofílicas, que se inactivan en medio ácido (Goodman y Gilman, 1990; Schlossberg, 1995) se trata de antibióticos naturales o semisintéticos obtenidos a partir de productos metabólicos de cultivos de cepas de *Streptomyces* spp. (Prescott, 2002; Shryock *et al.*, 1998; Mestorino y Errecalde, 2004; Sádaba y Azanza, 2005).

Los integrantes de este grupo incluyen principalmente a eritromicina y tilosina, además de otros compuestos tales como carbomicina, espiramicina, oleandomicina, claritromicina, azitromicina, telitromicina y tulatromicina (González-Piñera *et al.*, 1998).

II.2.3.2. Mecanismo de acción de los macrólidos: Se caracterizan porque actúan a nivel intracelular uniéndose al sitio "P" de la subunidad "50S" de los ribosomas de las bacterias, inhibiendo de este modo la síntesis proteica. Estos antibióticos se desempeñan como bacteriostáticos o bactericidas, según los diferentes microorganismos, la fase de crecimiento en que se encuentran las bacterias, la densidad de la población bacteriana y la concentración que alcanza el antibiótico en el sitio de la infección (Kirst y Sides, 1983; Giner *et al.*, 1995; Webster, 1996).

II.2.3.3. Uso de los macrólidos en medicina veterinaria: Los macrólidos se suelen utilizar como tratamiento alternativo seguro y eficaz a las penicilinas (Epstein *et al.*, 1997). Los macrólidos más usados son eritromicina, espiramicina y tilosina (Renard, 1994).

Son moléculas altamente efectivas contra un amplio rango de bacterias gram positivas y con limitada o nula actividad frente a la mayoría de las bacterias gram negativas (Bryskier *et al.*, 1993b; Edder *et al.*, 2002). Además, por su capacidad de penetrar hasta el lisosoma de los fagocitos, son particularmente activos contra micoplasmas y clamidias, microorganismos que pueden sobrevivir y reproducirse en el interior de estas células (Alós Cortés *et al.*, 2004; Sádaba y Azanza, 2005).

Las indicaciones generales incluyen infecciones de las vías respiratorias superiores, bronconeumonía, enteritis bacteriana, metritis, piodermatitis, infecciones urinarias, artritis y otras. En forma específica, eritromicina se utiliza para el tratamiento de la mastitis clínica y subclínica en vacas en lactancia (Wang y Leung, 2007). También, tilosina presenta muy buena actividad contra *Mycoplasma* spp. y espiramicina contra *Toxoplasma* (Rubio y Boggio, 2009). Otros macrólidos sintéticos de uso exclusivo en medicina veterinaria, especialmente en bovinos en infecciones respiratorias, son tilmicosina, que se obtiene a partir de la tilosina (Mestorino y Errecalde, 2004) y tulatromicina, derivada de los azálidos (Letavic *et al.*, 2002).

En esta familia se destaca la claritromicina, en la cual el grupo 6-hidroxilo fue sometido a una metilación, evitando así la formación del derivado espiroquetal y obteniendo un compuesto mucho más estable en el medio ácido (Bryskier *et al.*, 1993b; Mulazimoglu *et al.*, 2005). Dentro de los macrólidos de nueva generación se encuentran los ketólidos, tales como la telitromicina que presenta muy buena respuesta frente a infecciones respiratoria, incluidas aquellas causadas por cepas resistentes a beta-lactámicos y macrólidos, así como patógenos intracelulares (Alós Cortés *et al.*, 2004). Derivan de macrólidos de anillos de 14 carbonos en los que el agregado de los sustituyentes 3-ceto, metoxi en el C6 y carbamatos en C11 y C12, incrementa la actividad antimicrobiana, confiere una mayor estabilidad en medio ácido y mejora la biodisponibilidad por vía oral, así como también su actividad intracelular (Jalava, 2001; Alós Cortés *et al.*, 2004).

Debido a que los macrólidos son bases débiles liposolubles y poco solubles en agua (González-Piñera *et al.*, 1998), poseen capacidad para penetrar barreras celulares y presentan excreción hepática (Sádaba y Azanza, 2005), se concentran en la secreción biliar y en la leche, de allí la importancia de evaluar su eliminación por este mecanismo (Edder *et al.*, 2002).

II.2.3.4. Inconvenientes que producen los macrólidos: Estos compuestos presentan baja toxicidad, motivo por el cual se los emplea para el tratamiento de un amplio rango de infecciones (Aiello, 1998). La utilización incorrecta de estos antimicrobianos o el insuficiente tiempo de retirada aumentan la probabilidad de encontrar sus residuos en los productos de origen animal, como leche y carne, incrementándose el riesgo potencial para la salud de los consumidores, ya que pueden producir reacciones alérgicas y sensibilidad (Horie, 1995; Wang y Leung, 2007). Así por ejemplo, eritromicina y oleandomicina se

emplean con mucha frecuencia en formulaciones veterinarias, y sus residuos suelen encontrarse en carne, hígado, riñón, leche y huevos (Edder *et al.*, 2002).

Además, estos antibióticos pueden desarrollar antibioco-resistencia, en efecto, el uso masivo de macrólidos fue la principal causa de diseminación de resistencia entre agentes causales de infecciones tratadas con estos agentes debidas a *Staphylococcus* spp., así como miembros de la familia Enterobacteriaceae (Mulazimoglu *et al.*, 2005).

II.2.4. Antibióticos lincosamidas

La lincomicina fue aislada en el año 1962 a partir de *Streptomyces lincolnensis*. Dentro de este grupo de antibióticos se destacan la lincomicina y la clindamicina por utilizarse ampliamente en la práctica clínica.

II.2.4.1. Estructuras de las lincosamidas: La estructura consistente en un aminoácido unido a un aminoazúcar. La sustitución del átomo de un oxidrilo de la lincomicina por un cloro da lugar a la clindamicina. La lincomicina se produce naturalmente a partir de varias especies de *Streptomyces lincolnensis*, *Streptomyces spinosus* y *Actinomyces roseolus*, mientras que clindamicina es un derivado semisintético (Magerlein *et al.*, 1966).

II.2.4.2. Mecanismo de acción de las lincosamidas: Poseen un amplio espectro bacteriostático, puesto que al igual que los macrólidos evitan la elongación de las proteínas al unirse al ribosoma 50S e inhiben la peptidiltransferasa (Gale *et al.*, 1981; Dhawan y Thadepalli, 1982). Debido a que interfieren en la unión del complejo aminoácido-acil-ARNt, tienen un espectro de acción similar a los macrólidos, con buena acción frente a cocos gram positivos (*Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Enterococcus*) y bacterias anaerobias (a diferencia de los macrólidos) particularmente *Bacteriodes fragilis* y *Clostridium* spp., aunque no tienen actividad frente a bacterias gram negativas aeróbicas.

II.2.4.3. Uso de las lincosamidas en medicina veterinaria: En la clínica médica, las lincosamidas son los antimicrobianos preferidos para el tratamiento de osteomielitis o artritis por *Staphylococcus aureus*. Para el tratamiento de la mastitis clínica y subclínica del ganado vacuno, ovino y caprino se emplean la lincomicina y la pirlimicina por vía intramamaria (Barnas y Nimphius, 1996; Brugueras y García, 1998).

Cuando se administran por vía intramuscular, alcanzan elevada concentración hemática a los diez minutos luego a la inyección. Se eliminan por vía biliar, y también lo hacen por riñón, materia fecal y leche (Ruiz y Moreno, 2005; Rubio y Boggio, 2009).

II.2.4.4. Inconvenientes que producen las lincosamidas: La resistencia en este grupo es menos frecuente que en los macrólidos, aunque comparten los mecanismos y pueden presentar resistencia cruzada entre estas familias y las estreptograminas (Leclercq *et al.*; 1991; Bozdogan *et al.*, 1999; Abriouel *et al.*, 2008). Particularmente la clindamicina puede generar resistencia enzimática mediada por plásmidos (Devriese, 1980; Dutta y Devriese, 1981; Leclercq *et al.*, 1985; Liu y Douthwaite, 2002).

II.2.5. Antibióticos quinolonas

Las quinolonas constituyen un importante grupo de sustancias químicas sintéticas con acción bactericida que fueron descubiertas en la década de los años 1960. El ácido nalidíxico (ácido 1-etil- 1,4 dihidro-7-metil-4-oxo-1,8-naftiridin-3-carboxílico) fue el primero en emplearse, seguido de cinoxacina y ácido oxolínico. Respecto al primero, si bien su espectro no es muy amplio en comparación con las quinolonas más modernas, se utilizó principalmente para el tratamiento de infecciones urinarias y *Shigella dysenteriae* que es resistente a ampicilina y cotrimazole (Bennishet *et al.*, 1992) hasta la década de los años 1990, donde comenzaron a reportarse resistencia a la droga (Rahman *et al.*, 1994).

II.2.5.1. Estructuras y clasificación de las quinolonas: A finales de 1980, con el propósito de mejorar las propiedades farmacocinéticas y ampliar el espectro antimicrobiano, se desarrollaron las fluoroquinolonas, mediante la adición de un átomo de flúor en la posición 6 de algunas quinolonas originales (Wolfson y Hooper, 1989; Holtzaple *et al.*, 1997). Por ello, ciprofloxacina presenta una actividad antimicrobiana aproximadamente 1000 veces superior al ácido nalidíxico (Gau *et al.*, 1985), representando una de las quinolona más usada en el mundo (Norrby y Lietman, 1993).

Hacia finales de la década de 1990 surgen las quinolonas de cuarta generación que presentan un espectro antimicrobiano más amplio (Dana *et al.*, 2000). Entre ellas se destacan levofloxacina, trovafloxacina y moxifloxacina por poseer mayor actividad frente a bacterias gram positivas que ciprofloxacina (Gau *et al.*, 1985, Stein, 1996). Se destaca, por ejemplo la mayor actividad de las nuevas quinolonas frente a *S. pneumoniae*, *S. aureus*, especies de *Enterococcus*, *Mycoplasma* y *Chlamydia* (Chysky *et al.*, 1991, Dana *et al.*, 2000). Tabla II.4 presenta la clasificación de las quinolonas según la generación.

Tabla II.4. Clasificación de las quinolonas según su estructura

Clasificación	Agentes	Espectro Antimicrobiano
Primera Generación	Ácido Nalidixico Cinoxacina	Organismos Gram-negativos (pero no para <i>Pseudomonas</i> sp.)
Segunda Generación	Norfloxacina Lomefloxacina Enoxacina Ofloxacina Ciprofloxacina	Organismos Gram-negativos (incluidas <i>Pseudomonas</i> sp.), algunos Gram-positivos (incluido <i>Staphylococcus aureus</i> pero no <i>Streptococcus pneumoniae</i>) y algunos patógenos atípicos
Tercera Generación	Levofloxacina Sparfloxacina Gatifloxacina Moxifloxacina	Igual a los agentes de segunda generación pero mejora la actividad frente a gram-positivos (<i>Streptococcus pneumoniae</i> sensible o resistentes a la penicilina) y expande la actividad frente a patógenos atípicos.
Cuarta Generación	Trovafloxacina	Igual que los agentes de tercera generación pero cubre además microorganismos anaeróbicos

Fuente: Dana y col. (2000).

II.2.5.2. Mecanismo de acción de las quinolonas: La acción antimicrobiana de las quinolonas procede de la inhibición de ADN girasa bacteriana en las células (Smith y Lewin, 1988). Actualmente son antimicrobianos muy utilizados debido a su actividad sobre un amplio espectro de bacterias gram negativas como *Pseudomonas aeruginosa* y algunas gram positivas como estreptococos (Fernández y Chu, 1988). Se prescriben para el tratamiento de infecciones pulmonares, urinarias y digestivas (Lara *et al.*, 2006).

Las quinolonas son moléculas anfóteras, muy lipofílicas y poco hidrosolubles (Smith y Lewin, 1988). Las fluoroquinolonas más nuevas han mejorado los parámetros farmacocinéticos en comparación con las quinolonas originales. Se caracterizan porque se absorben en forma rápida en el tracto gastrointestinal, siendo la vía preferida en animales pequeños como cerdos y aves (Rubio y Boggio, 2009).

Las concentraciones séricas máximas obtenidas tras la administración oral son similares a los niveles alcanzados mediante administración endovenosa (Borcherding *et al.*, 1996). Además, estas moléculas presentan muy buena absorción en rumiantes adultos cuando se administran por vía intramuscular y subcutánea.

A excepción de la ofloxacina que no se metaboliza, las demás quinolonas se metabolizan en diferente grado. Algunos de sus metabolitos presentan actividad antimicrobiana como ciprofloxacina y norfloxacina que derivan de enrofloxacina y pefloxacina, respectivamente (Dana *et al.*, 2000).

Solamente ofloxacina y levofloxacina se eliminan en forma exclusiva por la vía renal (Wolfson y Hooper, 1989; Fitton, 1992). Según Brighty y Gootz (1997) otras quinolonas (ácido nalidíxico, cinoxacina, norfloxacina, ciprofloxacina, enoxacina, lomefloxacina y esparfloxacina) utilizan además vías no renales, tales como la gastrointestinal y hepática.

II.2.5.3. Uso de las quinolonas en medicina veterinaria: Las quinolonas se han utilizado para el tratamiento de enfermedades bacterianas, incluyendo severas infecciones sistémicas (Brunner y Zeiler, 1988). La mayoría de estas sustancias se absorben rápidamente desde el intestino, con una biodisponibilidad cercana al 90% y penetran bien en la mayoría de los tejidos y fluidos corporales. Sin embargo ciprofloxacina y la norfloxacina tienen menor biodisponibilidad debido al efecto de eflujo (Sorgel *et al.*, 1989; Lamp *et al.*, 1992). En medicina veterinaria, las fluoroquinolonas más empleadas son enrofloxacin, ciprofloxacina, marbofloxacina y danofloxacina (Rubio y Boggio, 2009). Por presentar una excelente seguridad y tolerabilidad, su uso constituye una alternativa de las penicilinas y las cefalosporinas (Borcherding *et al.*, 1996).

Debido a que las fluoroquinolonas tienen un gran volumen de distribución, se concentran en los tejidos a niveles que pueden superar sus concentraciones séricas. La penetración es particularmente alta en tejido renal, pulmón, próstata, bronquios, nasales, vesícula biliar, vía biliar y genitales (Stein, 1996; Garey y Amsden, 1999).

II.2.5.4. Inconvenientes que producen las quinolonas: Acar y Goldstein (1997) y Stein y Havlichek (1998) han reportado numerosos casos de resistencias a quinolonas, tanto por parte de bacterias gram positivas (*Staphylococcus aureus*) como gram negativas (*Pseudomona aeruginosa*). Estos autores atribuyen esta resistencia a las alteraciones en los estados enzimáticos de las quinolonas (ADN girasa), la disminución de la permeabilidad de la membrana externa o al desarrollo de mecanismos de eflujo.

Debido a los inconvenientes de resistencia que presentan numerosos microorganismos a estas moléculas, resulta importante controlar la presencia de residuos de quinolonas en la leche los alimentos para evitar su llegada al consumidor.

II.2.6. Antibióticos sulfamidas

Las sulfonamidas se han utilizado durante muchas décadas en la medicina veterinaria. Actualmente su uso ha disminuido por el desarrollo de nuevas moléculas antimicrobianas. Sin embargo, se continúan empleando con fines terapéuticos y profilácticos, tanto en medicina humana (Kim y Park, 1998) como en medicina veterinaria (Schwarz y Chaslus, 2001). Además, suelen utilizarse como aditivos en la alimentación animal, puesto que su ingestión prolongada puede tener un efecto estimulante sobre el crecimiento (Long *et al*, 1990; Dixon y Katz, 1991).

II.2.6.1. Estructuras de las sulfamidas: Estructuralmente, las sulfamidas poseen un anillo común p-aminobenzoico que contiene un grupo aromático con un sustituyente amino en la posición N-4 y difieren en el sustituyente "R" de la posición N1 (Figura II.1). Esta estructura resulta fundamental en su acción antibacteriana, debido a su similitud con el ácido para-aminobenzoico, precursor del ácido fólico y de los ácidos nucleicos de las bacterias (Pastor-Navarro *et al.*, 2004).

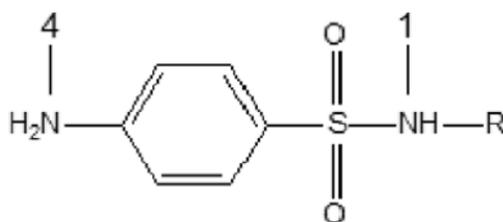


Figura II.1. Estructura básica de las sulfamidas.

El sustituyente "R" puede tomar distintas estructura químicas, dando lugar a diferentes tipos de sulfamidas que se caracterizan por presentar diferentes propiedades fisicoquímicas y fármaco cinéticas, así como distinto grado de actividad antimicrobiana.

II.2.6.2. Mecanismo de acción de las sulfamidas: Los mamíferos utilizan el ácido fólico de los alimentos para llevar a cabo la síntesis de los ácidos nucleicos, mientras que las bacterias y otros microorganismos sintetizan el ácido fólico de novo a partir de precursores químicos tales como el ácido para-aminobenzoico (PABA) (Skold, 2000).

A través de una serie de interacciones, el PABA se convierte en ácido dihidrofólico (ácido fólico) por la acción secuencial de las enzimas dihidropteroato sintetasa y dihidrofolato reductasa. Las sulfamidas actúan en este nivel gracias a su analogía estructural con el PABA. La enzima dihidropteroato sintetasa incorpora sulfamida en vez de PABA, en un intento por sintetizar ácido fólico. Esta acción de bloqueo de la síntesis de precursores del ácido fólico es competitiva, por lo cual se puede invertir cuando aumenta el nivel de PABA en el medio interno bacteriano (Huovinen, 2001; Greenwood, 2003).

Por otra parte, las diaminopirimidinas se comportan como inhibidores competitivos de la enzima dihidrofolato reductasa, necesaria para la conversión del dihidrofolato a tetrahidrofolato. Como consecuencia de ello, una combinación de sulfamidas con diaminopirimidinas (e.g. trimetoprima, pirimetamina, etc.), altera de manera secuencial la síntesis de proteínas y los mecanismos de replicación microbiana (Haagsma *et al.*, 1987; Periti, 1995; Reynolds, 1995; Aparicio *et al.*, 2003). Por este motivo, las sulfamidas manifiestan una acción sinérgica con los antifolatos y se administran en forma conjunta.

II.2.6.3. Uso de las sulfamidas en medicina veterinaria: En medicina veterinaria se utilizan sulfadiazina, sulfadimetoxina, sulfametoxazol, sulfadosina y sulfadimidina. En algunas infecciones inespecíficas de los animales, el 90% de las bacterias anaerobias aisladas son sensibles a la asociación trimetoprim - sulfamidas (Van Rhijn *et al.*, 2002).

En lo que respecta a la eliminación de las sulfamidas, una vez administrado este fármaco al animal, se eliminan la molécula original y algunos de sus metabolitos. Así, por ejemplo, un estudio realizado por Nielsen (1979) donde evalúa la eliminación de

sulfanilamida, sulfodimidina, sulfametoxazol y sulfadoxina administradas mediante inyección por vía intravenosa en vacas lecheras, demuestra que las sulfonamidas se excretan en la leche y la orina como la molécula madre sin cambios y como metabolitos conjugados (derivados N4-acetil).

Por ello, la eliminación en la leche de estos compuestos constituye un potencial riesgo en caso que no se respeten los períodos de retirada antes del ordeño de los animales tratados con sulfamidas (Saschenbrecker y Fish, 1980; Franco *et al.*, 1990; McEvoy *et al.*, 1999; Agarwal, 1992).

II.2.6.4. Inconvenientes que producen las sulfamidas: Entre los problemas que pueden ocasionar estas moléculas sobre la salud del consumidor, se destaca su potencial actividad carcinogénica, de gran importancia en la seguridad alimentaria. A modo de ejemplo, Littlefield (1990) destaca la actividad carcinogénica de algunos residuos de sulfamidas (sulfametazina) en leche.

También Bevill (1984) y Montanaro (1998) han reportado que aproximadamente 5% de pacientes humanos tratados con las sulfamidas, desarrollaron efectos indeseados como reacciones alérgicas o tóxicas.

II.2.7. Antibióticos tetraciclinas

Clortetraciclina fue la primer molécula que se utilizó en la clínica médica en el año 1948 (Harman y Limbird, 2001). Desde allí, se consideró a las tetraciclinas como antibióticos de “amplio espectro”, por ser muy eficaces contra diversas bacterias gram positivas y gram negativas.

En principio, las tetraciclinas se aislaron de diversas especies de *Streptomyces*. Posteriormente, a esta molécula se le efectuaron numerosas sustituciones estructurales

para dar lugar a nuevas tetraciclinas semisintéticas con diferentes propiedades farmacocinéticas y actividades antimicrobianas (Klein, 1995; Joshi y Miller, 1997).

La eficacia de las tetraciclinas disminuyó en los últimos años debido a la existencia de genes resistentes, probablemente por su prolongado y extenso uso a nivel humano y como promotores del crecimiento en animales (Chopra, 2002; Betriu *et al.*, 2002).

II.2.7.1. Estructuras y clasificación de las tetraciclinas: Las tetraciclinas constituyen un grupo de productos naturales (clortetraciclina, oxitetraciclina, tetraciclina y demeclociclina) y semisintéticos (metaciclina, doxiciclina, minociclina, limeciclina, rolitetraciclina y tigeiciclina) derivados de diferentes especies de *Streptomyces* spp. que inhiben la síntesis de las proteínas bacterianas (Klein, 1995; Joshi y Miller, 1997; Smilack, 1999; Pérez-Trallero e Iglesias, 2003). Las tetraciclinas se clasifican en tres generaciones, según la evolución que experimentaron la síntesis de estos compuestos (Tabla II.5).

Tabla II.5. Clasificación de las tetraciclinas según su evolución en la elaboración

Generación	Período	Tetraciclinas	Características
Primera	1948-1963	Clortetraciclina Oxitetraciclina	Producidas por dos especies de <i>Streptomyces</i> .
		Tetraciclina Demeclociclina	Producidas por dos diferentes especies de <i>Streptomyces</i> .
		Rolitetraciclina Limeciclina Clomociclina	Derivados semisintéticos hidrosolubles
Segunda	1965-1972	Meclociclina Doxiciclina Minociclina	Derivados semisintéticos de las anteriores
Tercera	1993-continúa	Glicilciclinas	Fase experimental

Desde el punto de vista estructural, las tetraciclinas poseen un núcleo tetracíclico compuesto de cuatro anillos fusionados, como se muestra en la Figura II.2. La sustitución de diferentes grupos funcionales en posiciones "R", "R1" y "R2" da lugar a numerosos compuestos que se clasifican en las tres generaciones (Pérez-Trallero e Iglesias, 2003).

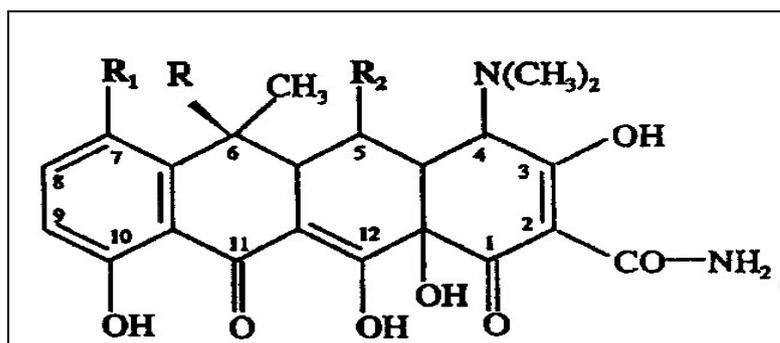


Figura II.2. Estructura química del núcleo común de las tetraciclinas

II.2.7.2 Mecanismo de acción de las tetraciclinas: Se caracterizan porque actúan inhibiendo la biosíntesis proteica a nivel de los ribosomas 70 y 80s, impidiendo la transcripción del mensaje genético al imposibilitar la unión del ARN mensajero con la subunidad 30s del ribosoma bacteriano. Este hecho produce el bloqueo en la iniciación de la cadena polipeptídica (Morejón *et al.*, 2003).

Las tetraciclinas presentan en general una buena actividad contra los microorganismos *Bacillus* spp., *Corynebacterium* spp., *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus* spp., *Actinobacillus* spp., *Bordetella* spp., *Brucella* spp., *Francisella tularensis*, *Haemophilus* spp., *Pasteurella multocida*, *Yersinia* spp., *Actinomyces* spp., *Fusobacterium* spp., *Chlamydia* spp., *Rickettsia* spp., además de algunos protozoos y *Anaplasma* spp. (Prescott y Baggot, 2002).

También poseen actividad antimicrobiana frente a algunas especies de *Estafilococos*, *Enterococos*, algunos miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (*Enterobacter* spp., *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Salmonella* spp.) y algunos

anaerobios como *Bacteroides* spp., y *Clostridium* spp. Por el contrario, algunas infecciones resultan resistentes a las tetraciclinas, especialmente aquellas que proceden de *Mycobacterium* spp., *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia* spp., y algunos *Mycoplasma* spp. (Adams, 2003).

II.2.7.3. Uso de las tetraciclinas en medicina veterinaria: Se emplean en el tratamiento de infecciones sistémicas como enteritis bacterianas, metritis, mastitis entre otras, y locales, como la queratoconjuntivitis infecciosa en ganado bovino, la clamidiasis y la actinobacilosis entre otras enfermedades específicas (Zorraquino, 2005).

En producción animal, las tetraciclinas son los antibióticos más utilizados a nivel mundial y en la Comunidad Económica Europea (Fedesa, 1999). No obstante su uso actual en el ganado vacuno lechero está muy limitado a favor de los antibióticos de “nueva generación” como las cefalosporinas de 3ª y 4ª generación, nuevos aminoglucósidos, y las fluoroquinolonas (Busani *et al.*, 2003, 2004). En bovinos se administran principalmente por vía intravenosa o parenteral para tratar la mastitis colibacilar y la endometritis infecciosa (Sumano y Ocampo, 1997).

La mayoría de las tetraciclinas pueden administrarse por vía endovenosa o bien en forma intramuscular como la oxitetraciclina. En el ganado bovino, la administración oral está contraindicada por dañar severamente a la flora de los preestómagos e intestino (Schumaner, 1962). Panjarathinam *et al.* (1974) demostraron que la dosis única de 150 mg de oxitetraciclina o de clortetraciclina vaca/día reduce el contenido bacteriano total del líquido ruminal desde $0,9 \cdot 10^9$ bacterias/ml hasta $0,36 \cdot 10^9$ bacterias/ml. Además, Gyrd-Hansen *et al.* (1981) señalan que la administración de tetraciclina por vía endovenosa a bovinos produce colapso agudo, probablemente como consecuencia de su unión con los iones calcio y el consiguiente efecto depresor sobre el sistema cardiovascular.

Estos fármacos se acumulan en células reticuloendoteliales de hígado, bazo y médula ósea, además de adsorberse en huesos por su elevada afinidad por los iones calcio (Adams, 2003). Las tetraciclinas se encuentran presentes en orina, líquido prostático y leche. Sin embargo, principal vía de eliminación se realiza mediante el riñón a excepción de la minociclina y la doxiciclina que se concentran en el hígado y son excretadas por la bilis. Las tetraciclinas pasan luego a los intestinos, donde pueden reabsorberse y reincorporarse a la recirculación enterohepática (Kunin y Finland, 1961).

La tetraciclina se elimina en leche después de su administración por vía parenteral. Esta eliminación persiste durante 42 horas, llegando a veces a las 54 horas luego de una inyección de 1,5 g/vaca (Honh y Rasmussen, 1972).

II.2.7.4. Inconvenientes que producen las tetraciclinas: Desde el punto de vista de la salud del consumidor, las tetraciclinas, al igual que otros antibióticos, pueden causar dificultades asociadas con síntomas de alergia y el desarrollo de resistencia de los microorganismos en los seres humanos (McManus, 1997; Demoly y Romano, 2005). En las empresas lácteas, la presencia de tetraciclinas en la leche puede dar lugar a pérdidas económicas, puesto que inhiben starter de los medios de cultivos y producen modificaciones de las características organolépticas de los productos fermentados como queso y yogurt (Perreten y Teuber, 1995; Packham *et al.*, 2001).

II.3. Aspectos Legales

En las últimas décadas, el concepto de calidad de la leche ha cobrado gran importancia, debido principalmente a los problemas que pueden producir los residuos de agentes antimicrobianos a la industria láctea y a la salud del consumidor (Khan *et al.*, 2000; Packham *et al.*, 2001; Demoly y Romano, 2005; Wilke *et al.*, 2005; Berruga *et al.*, 2007; Bradley y Green, 2009).

El uso prudente de productos antimicrobianos en medicina veterinaria, debe servir para mantener la eficacia antibiótica de los productos y evitar que el ser humano se vea expuesto por vía alimentaria a estos residuos, evitando de este modo el desarrollo de organismos resistentes (Anthony *et al.*, 2001).

II.3.1. Límite Máximo de Residuos

Para proteger a la salud pública de los residuos de antibióticos en los productos alimenticios, se han establecido los Límites Máximos de Residuos (LMRs) para los alimentos de origen animal, incluyendo carne, pescado, leche, huevos y miel. Los LMRs se basan en el tipo y cantidad de residuo que se consideran que no constituyen ningún riesgo toxicológico para la salud humana, tal y como expresa la dosis diaria admisible (DDA).

Para controlar la presencia de residuos de medicamentos en los alimentos, las diferentes legislaciones, como Codex Alimentarius, Unión Europea y Código Alimentario Argentino han establecido los Límites Máximos de Residuos (LMRs). Así, en la Unión Europea, el Grupo de trabajo de Seguridad de Residuos del Comité de Medicamentos Veterinarios (CVMP, del inglés Committee for Veterinary Medicinal Products) fijó los LMRs para diferentes productos alimenticios. El mecanismo por el cual se regula la determinación de los LMRs está legislado en el Reglamento 2377/90/CEE (CEE, 1990), donde se clasifican los principios activos de los medicamentos en los anexos I, II o III y IV.

El Anexo I incluye aquellas sustancias cuyos LMRs se han establecido para uno o más productos animales y en el Anexo II se encuentran aquellas que no es necesario establecer su LMR porque se consideran seguras. El Anexo III contempla las sustancias que tienen un LMR provisional (MRLP, pendiente de más estudios), mientras que el Anexo IV resume los agentes que no poseen LMR porque se consideran que son inseguros para el consumidor y su presencia constituye un riesgo para la salud del mismo (cloranfenicol, nitrofuranos, etc.), por ello su uso está terminantemente prohibido.

Este Reglamento define los residuos de medicamentos veterinarios como *“todas las sustancias farmacológicas activas, ya sean principios activos, excipientes o productos de degradación, y sus metabolitos que permanezcan en los productos alimenticios obtenidos a partir de animales a los que se les hubiere administrado el medicamento veterinario de que se trate”*.

Se define al Límite Máximo de Residuo (LMR) de Medicamentos Veterinarios (RMV) como: *“el contenido máximo (concentración) de residuos resultante de la utilización de un medicamento veterinario (expresado en mg/kg o g/kg sobre la base del peso en fresco) autorizada en la Comunidad o reconocida como admisible en un producto alimenticio”*.

En Tabla II.6 se muestran los LMRs establecidos por el Codex Alimentarius, la Unión Europea y niveles de tolerancia en USA de antimicrobianos en leche. En Europa, cada Estado Miembro de la UE podrá establecer sus propias autorizaciones a nivel nacional.

Sin embargo, mediante la Directiva CEE/82/2001, se crea un Comité de medicamentos veterinarios, que facilita la adopción por parte de los Estados miembros de decisiones comunes sobre autorización de medicamentos veterinarios basándose en los criterios científicos de calidad, seguridad y eficacia, y conseguir así la libre circulación de medicamentos veterinarios en la UE. La determinación de los LMRs es competencia del Grupo de trabajo de Seguridad de Residuos del Comité de Medicamentos Veterinarios (CVMP, *del inglés Committee for Veterinary Medicinal Products*). El Reglamento CEE/2377/1990 regula el establecimiento de los LMRs en la UE.

Tabla II.6. Límites máximos de residuos (LMRs) establecidos por el Codex Alimentarius, Unión Europea y niveles de tolerancia en USA de antimicrobianos en leche

Sustancia	LMR Codex ¹	LMRs EU ²	SL/Tolerance USA ³
<i>β-lactámicos</i>			
Penicilina (Benzil-,G)	4	4	5
Ampicilina		4	10
Amoxicilina		4	10
Cloxacilina		30	10
Dicloxacilina		30	
Oxacilina		30	
Nafcilina		30	
Ceftiofur [®]	100	100	50
Cefapirina		60	20
Cefazolina		50	
Cefquinoma		20	
Penetamato		4	
Acido Clavulánico		200	
<i>Tetraciclinas</i>			
Clortetraciclina		100	300
Oxitetraciclina	100	100	300
Tretetraciclina		100	300
<i>Sulfonamidas(todas)</i>			
Sulfadimidina	25	100	10
Sulfadimetoxina		100	10
Sulfameracina		100	10
Sulfatiazol		100	10
Sulfadiazina		100	10
<i>Macrólidos</i>			
Eritromicina		40	50
Espiramicina	200	200	
Tilmicosina		50	
Tilosina		50	50
<i>Aminoglucósidos</i>			
Gentamicina		100	30
Neomicina	500	1500	150
Espectinomina		200	
DH/Estreptomina	200	200	125
<i>Quinolonas</i>			
Enrofloxacina		100	
Flumequine		50	
Marbofloxacina		75	
<i>Varios</i>			
Baquiloprim		30	
Cloranfenicol		0	0
Celestina		50	
Dapsona		0	
Novobiocina		50	100
Rifaximina		60	
Trimetoprim		50	

Unidades: µg/Kg

¹Codex Alimentarius (<http://apps1.fao.org/servlet/org.fao.waicent.codex.VetDrugServlet>) 30 Marzo 2007;²Reglamento 2377/90 y sucesivos reglamentos modificadores. Enero 2009; ³Code of Federal Regulation (CFR) 21 Part 556 (M-I-05-5) 27 Setiembre Junio 2005: Safe level y/o Tolerance (FDA, 2003).

II.3.2. Reglamentación en la Argentina

En Argentina, por medio del DECRETO 815/1999 del Poder Ejecutivo Nacional, se establece el Sistema Nacional de Control de Alimentos (SNCA) con el objetivo de asegurar el cumplimiento del Código Alimentario Argentino (CAA), que es la norma fundamental del SNCA y que integra a la Comisión Nacional de Alimentos (CONAL), al Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) y a la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT).

La calidad de alimentos está regulada por el Código Alimentario Argentino (CAA), ampliado con normas del MERCOSUR y del CODEX, a través de sus artículos 555, 556, 556 bis del Capítulo VIII. En el artículo 556 del CAA, se describen los valores de Límites Máximos de Residuos (LMRs) de plaguicidas y antibióticos que puede estar presente en la leche. Dichos valores fueron aprobados por la Comisión del Codex Alimentario en su décimo séptimo período de sesión.

El SENASA, por medio de la Resolución N° 256/2003, adoptó los LMRs establecidos por el CODEX (CODEX, 1996, 2007), aunque se debe destacar que, en caso de realizar exportaciones a USA o países miembros de la Unión Europea, los límites de residuos estarán condicionados a las reglamentaciones de cada país.

En Argentina, el plan CREHA (Plan Nacional de Control de Residuos e Higiene en Alimentos) persigue como objetivo preservar los productos de la alimentación humana según lo establecido en el Cap. IX del Dec. 4238/68 - Resolución 290. Este plan prioriza los residuos químicos, aditivos, toxinas y microorganismos que se controlarán mediante un programa anual. Además determina aquellos que constituyen un mayor riesgo para la salud pública, cumpliendo de esta manera con las exigencias y los Límites Máximos Admitidos, según las legislaciones y normas nacionales e internacionales vigentes.

Por su parte, SENASA solicita análisis para antibióticos, tetraciclinas, cloranfenicol, sulfonamidas, ivermectina, albendazol, plomo, cadmio, arsénico, mercurio, aflatoxinas,

clorados y fosforados. Los muestreos se deben realizar cada dos meses, 1 o 2 veces al año, según la cantidad de litros anuales que se procesen (nivel de producción I, II, III). Los resultados deben ser inferiores a los LMRs que establece el CODEX y los métodos analíticos recomendados para analizar las muestras de leche son la cromatografía en capa fina, HPLC, electroforesis, ELISA, bioensayos, métodos microbiológicos, entre otros (SENASA, 1999, 2000, 2001, 2003).

II.4. Métodos de screening para el control de antibióticos en la leche

Los primeros métodos microbiológicos para la detección de residuos de antibióticos en la leche comenzaron a utilizarse en la década de los años 1950 (Bishop y White, 1984). Estos métodos se basaban fundamentalmente en pruebas de inhibición microbiológicas como la difusión en agar, la inhibición de la producción de ácido, o la inhibición de la coagulación de cultivos iniciadores (Mitchell *et al.*, 1998). Desde entonces, muchas propiedades de estos métodos se han mejorado, como rapidez de la respuesta, exactitud, sencillez, sensibilidad y durabilidad.

Posteriormente, se desarrollaron nuevos métodos basados en técnicas inmunológicas o de receptores proteicos/microbianos que han reducido los tiempos de ensayo a escasos minutos. En las últimas tecnologías, se han desarrollado los denominados biosensores de alta especificidad y sensibilidad, basados en la combinación de técnicas inmunoenzimáticas con aplicaciones electrónicas, que ofrecen un futuro prometedor dentro del campo de la inocuidad de los alimentos.

Heeschen y Suhren (1995) sugieren que se debe realizar un control primario mediante el empleo de “métodos lentos” de tipo microbiológicos que permitan garantizar la ausencia de antimicrobianos en la leche y/o “métodos rápidos” específicos como los enzimáticos, de receptores proteicos, etc. que identifican el tipo de familia a la cual

pertenece(n) los antimicrobiano(s), como por ejemplo los métodos específicos para la detección de residuos de antibióticos betalactámicos.

En la Unión Europea, mediante la Decisión CEE/657/2002 (CEE, 2002) se establece que los métodos de control se dividen en dos grupos, métodos de "cribado" (o screening) y métodos de "confirmación posterior". En el primer grupo se incluyen aquellos métodos rápidos que se utilizan para detectar la "presencia" o "ausencia" de sustancias, mientras que en el segundo grupo se incluyen aquellas técnicas analíticas que suministran información total y complementaria para identificar y cuantificar de manera inequívoca los residuos presentes en la leche.

II.4.1. Propiedades de los Métodos Cualitativos

Los métodos cualitativos, al igual que los cuantitativos, deben cumplir una serie de propiedades antes de utilizarse en un sistema de control de residuos o ser implementados en un plan de inocuidad. En la Tabla II.7 se resume las principales propiedades que deben considerarse en los estudios de validación de técnicas analíticas según la Decisión 2002/657/EC de la Unión Europea.

Tabla II.7. Propiedades a evaluar para la validación de diferentes métodos analíticos

Característica performance	Métodos cualitativos		Métodos cuantitativos	
	Screening	Confirmatorio	Screening	Confirmatorio
Capacidad Detección $CC\beta$	+	+	+	+
Capacidad Decisión $CC\alpha$	-	+	-	+
Recuperación	-	-	-	+
Presición	-	-	+	+
Selectividad	+	+	+	+
Robustez Estabilidad	+	+	+	+

Fuente: Decisión 2002/657/EC.

Estas propiedades varían dependiendo de la técnica analítica. Así, para los métodos cuantitativos (tales como cromatografía HPLC o HPLC-MS-MS) se requieren capacidad de detección ($CD\alpha$) y cuantificación ($CC\beta$), porcentaje de recuperación, precisión, selectividad y robustez, mientras que para el caso específico de los métodos cualitativos o “screening”, se deben evaluar únicamente los parámetros de selectividad, capacidad de detección y robustez. Aunque la guía ISO/FDIS 13969 (IDF-FIL, 2002) destaca la importancia de llevar a cabo estudios de tipo colaborativos (reproducibilidad) y la IDF-FIL (1997) sugiere efectuar estudios de sensibilidad.

Por ello, y debido a la importancia que reviste el análisis de estas propiedades en los métodos de screening o cribado, a continuación se desarrollarán las propiedades que deben considerarse durante un proceso validación de estos métodos, haciendo especial referencia a los métodos microbiológicos, motivo de este trabajo.

II.4.1.1. Selectividad de los métodos de screening: La selectividad es un parámetro de gran utilidad para la evaluación de un método, ya que señala la ausencia de un analito en la muestra a analizar, cuando está libre de este analito. Esta propiedad está asociada con la presencia de resultados “anómalos” o también denominados “falsos positivos”. En efecto, estos resultados proceden de muestras libres del analito y producen una respuesta positiva al método, constituyendo una debilidad de algunos test de screening, ya que, las muestras deben someterse a un análisis de confirmación posterior que demanda esfuerzo y dinero. En este sentido, se pretende que un buen método de screening presente una elevada selectividad y por lo tanto una baja frecuencia de falsos positivos.

Para el cálculo de la selectividad, se debe disponer de un elevado número de muestras negativas (IDF-FIL, 2002). La selectividad se calcula como la frecuencia relativa porcentual entre los resultados negativos al método de screening, partida por el número total de muestras analizadas libres del analito (Sischo y Burns, 1993).

Cuando se estudia el efecto que produce la adición de un determinado tipo de conservante sobre la respuesta de un método, se trata de producir la menor interferencia posible en la respuesta, es decir, se busca conservar la selectividad original del método. Un estudio realizado por Molina *et al.* (2003) donde analizan 2322 muestras de leche de oveja, observan que la incorporación de azidol como conservante produce una disminución de la selectividad de los métodos de inhibición microbiológica BRT[®]AiM (90,2 %) y Delvotest[®] "SP" (91,0 %) en comparación con las mismas muestras analizadas sin la adición de conservante (94,8% para el método BRT[®]AiM y 95,3% para el método Delvotest[®]).

En Tabla II.8 se resumen algunos valores de selectividad calculados por diferentes autores para los métodos más difundidos en la detección de residuos de antibióticos en la leche. Así, los estudios realizados por Sischo y Burns (1993) obtienen para el método Delvotest[®] SP una selectividad elevada (0,950) ligeramente inferiores a las 0,976 determinado por Charm y Zomer (1995) al utilizar el mismo método con leche de vaca.

Tabla II.8. Selectividad de diferentes métodos de screening utilizados para la detección de residuos de antibióticos en leche.

Método	Selectividad	Leche	Referencia
Delvotest [®] SP	0,95	Vaca	Sischo y Burns (1993)
Delvotest [®] SP	0,976	Vaca	Charm y Zomer (1995)
Penzym [®]	0,908	Vaca	Charm y Zomer (1995)
Penzym [®]	0,91	Vaca	Andrew (2000)
BRT [®] AiM	0,99	Vaca	Roca <i>et al.</i> (2007)
Charm [®] Blue Yellow	1,00	Vaca	Roca <i>et al.</i> (2007)
Delvotest [®] SP	0,98	Vaca	Roca <i>et al.</i> (2007)
Eclipse [®] 100 ov	0,99	Vaca	Roca <i>et al.</i> (2007)
ResScreen [®] BT	0,979	Vaca	Nagel (2009)
ResScreen [®] BS	0,985	Vaca	Nagel (2009)
BRT [®] AiM	0,963	Oveja	Molina <i>et al.</i> (2003)
Delvotest [®] SP	0,977	Oveja	Molina <i>et al.</i> (2003)
Eclipse [®] 100 ov	0,994	Oveja	Montero <i>et al.</i> (2005)

Roca *et al.* (2007) en España señalan elevados valores de selectividades para los métodos microbiológicos BRT[®] AiM (99%), Charm[®] Blue Yellow (100%), Copan[®] CH-ATK (100%), Delvotest[®] SP (98%) y Eclipse[®] (99%). También los métodos rápidos presentaron alta especificidad para Beta[®] Star (97%), Delvo[®] XP (99%), ROSA[®] MRL BL (100%), SNAP[®] BL (100%), SNAP[®] TET (100%), Twinsensor[®] (98%) y mediana para el método Penzym[®] (82%).

Para el método ResScreen[®], Nagel (2009) obtiene elevados valores de selectividad, tanto para el Bioensayo BT (0.979) como para el Bioensayo BS (0.985).

En leche de otras especies, Molina *et al.* (2003) calculan buenas selectividades cuando los métodos microbiológicos BRT[®] AiM (0,963) y Delvotest[®] SP (0,977) son empleados con muestras de leche de oveja. También Montero *et al.* (2005) determinan una selectividad de 0,994 cuando analizan muestras de leche de oveja con el método Eclipse[®] “100 ov”.

En leche de oveja, Molina *et al.* (2003) cuando analizan 2322 muestras señalan que la selectividad de las muestras aumenta cuando se someten a un tratamiento térmico de 82°C/10 min (99,0% BRT[®] AiM y 98,7% Delvotest[®]) en comparación con las mismas muestras sin calentar (96,3% BRT[®] AiM y 97,7% Delvotest[®]).

II.4.1.1.1. Resultados anómalos o falsos positivos de los métodos de screening: Se considera a un resultado “falso positivo” cuando luego de analizar una muestra de leche que no contiene residuos de antibióticos por el método de referencia o de naturaleza conocida, presenta un resultado positivo a la prueba. Cullor *et al.* (1992) llamaron la atención sobre los resultados que se denominan “falsos positivos” o “anómalos”, puesto que algunos métodos tuvieron que retirarse del mercado o modificarse por las casas productoras a fin de minimizar estos resultados erróneos.

Según Brouillet (1994), algunas de las causas que explican los motivos de estos resultados erróneos o “falsos positivos” son exceso de sensibilidad de los métodos debido al agregado de sustancias sinérgicas como trimetoprim, etc.; calentamiento previo de la muestra de leche que puede destruir en parte a ciertos antibióticos (Zorraquino, 2008a, 2008b, 2009); mala conservación de la leche, ya que puede incrementarse la flora microbiana acompañada de la consiguiente acidificación de la leche y una destrucción de ciertos antibióticos y falta de respeto de los protocolos de los análisis, en especial lo referente a la temperatura y tiempo de análisis, que en ocasiones no se mantienen.

También, Zorraquino (1996) expone en la Tabla II.9 las posibles interferencias que pueden afectar a los métodos de detección de inhibidores y ocasionar resultados “falsos positivos”. Las principales causa se pueden atribuir a inhibidores naturales de la leche, procesos inflamatorios de la glándula mamaria y en menor grado a la contaminación con productos de limpieza.

Tabla II.9. Interferencias con los métodos de detección de inhibidores

-
1. Inhibidores naturales
 - Lisozima
 - Lactoferrina
 - Lactoperoxidasa
 2. Lipólisis.
 3. Reacción inflamatoria.
 - Lisozima y Lactoferrina
 - Células somáticas
 4. Leche anormal final de lactación.
 5. pH < 6,00.
 6. Contaminación fúngica del silo.
 7. Residuos de antiparasitarios.
 8. Aditivos de piensos (minerales, Cu).
 9. Residuos de agentes de limpieza.
 10. Conservantes adicionados a la leche (Azidiol).
-

Fuente: Zorraquino, 1996.

Diversos autores han estudiado y comparado los métodos de detección de inhibidores, calculando las frecuencias de resultados “falsos positivos” que aparecen en cada método. Carlsson y Bjorck (1989b), Cullor (1992), Cullor *et al.* (1992, 1994) y Tyler *et*

al. (1992) señalaron en leche de vaca, que la exactitud de los métodos varía mucho cuando los métodos se emplean con muestras de leche procedentes de animales individuales puesto que aumentan los resultados “falsos positivos”.

Un estudio realizado por Seymour *et al.* (1988b), señala un 17% de resultados “falsos positivos” cuando analizan 122 muestras de leche de vaca con los métodos Delvotest[®] SP, Penzym[®] y el método de referencia de la difusión de discos. También Macaulay y Packard (1981) encontraron un 11% de resultados “falsos positivos” con Delvotest[®] SP, en muestras de leche sin antibióticos, comparados con el método de referencia. En la Universidad de Pensylvania, Sischo y Burns (1993) obtienen una relación de selectividad del 0,95 para el método Delvotest[®] “P” en comparación el método de referencia Bst Disk Assay.

Un estudio realizado con 313 muestras de leche de oveja en diferentes estadios de la lactación, Althaus *et al.* (2003) señalan que los elevados recuentos de células somáticas unido a un bajo porcentajes de sólidos totales son la causa de los resultados “falsos positivos” del método BRT[®] AiM, mientras que estos resultados anómalos se originan en el método Delvotest[®] cuando se analizan muestras de leche de oveja con elevados recuentos de células somáticas y altas concentraciones de iones tiocianatos, los cuales podrían activar al sistema lactoperoxidasa de la leche.

II.4.1.2. Sensibilidad de los métodos de screening: La sensibilidad es un parámetro que resulta de gran utilidad para evaluar la capacidad para detectar la presencia de un antibiótico a un nivel equivalente a su LMR. Por ello, se define a la sensibilidad de un método como la frecuencia relativa porcentual de resultados positivos al test cuando se analizan muestras de leche que contienen al antibiótico a una concentración establecida por la legislación (Zeng *et al.*, 1996).

Para determinar la sensibilidad de un método microbiológico, se deben emplear muestras de leche controles negativos, es decir, muestras de leche libres de sustancias inhibitoras. Según la IDF-FIL (1997), la sensibilidad se determina mediante la preparación de 30 disoluciones patrones de muestras de leche con concentraciones equivalentes al LMR de cada fármaco. El cálculo se efectúa como el cociente porcentual entre el número de respuestas positivas al método, partido por el número total de determinaciones realizadas (n=30).

Con respecto a los métodos microbiológicos se puede establecer que el método Delvotest[®] SP es muy sensible a penicilina en leche, cuando se utiliza con muestras procedentes de tanque o de animales individuales (Bishop *et al.*, 1985). Así, concentraciones inferiores a 0,002 UI/ml otorgan resultados negativos, mientras que concentraciones de 0,004 y 0,005 UI/ml presentan resultados dudosos y positivos, respectivamente.

Los estudios de Mc Grane *et al.* (1996) permitieron calcular con el método Delvotest[®] SP una sensibilidad del 98% para la cloxacilina, un 100% para la sulfametazina y menos de un 50% para la tetraciclina, mientras que el método Charm[®] AIM-96 presenta una sensibilidad del 38% para la cloxacilina, 65% para la sulfametazina e inferior al 50% para la tetraciclina. Ninguno de los dos métodos posee sensibilidad para detectar residuos de cloranfenicol y estreptomicina.

Scanella *et al.* (1997) determinaron para el método Delvotest[®] SP una sensibilidad del 100% para la penicilina, ampicilina y cloxacilina cuando se encuentran presentes a 3,6, 6, y 30 µg/l, respectivamente.

Roca *et al.* (2007) analizan la sensibilidad de los antibióticos más empleados en el tratamiento de la mastitis en España mediante los métodos microbiológicos. Dicho estudio señala que los métodos microbiológicos (BRT[®] AiM, Charm[®] Blue Yellow, CMT[®] Copan, Delvotest[®] SP-NT, Delvotest[®] Accelerator y Eclipse[®]) presentan buena sensibilidad para

detectar residuos de penicilina, cloxacilina, cefoperazone (100%), amoxicilina (entre 83,3% y 100%), ampicilina (entre 70% y 100%), dicloxacilina (entre 80% y 100%), cefalexina (entre 90% y 100%), cefalonio (76,5% y 100%), pero no presentan sensibilidad para los residuos de gentamicina, estreptomina, kanamicina, lincomicina, oxitetraciclina y enrofloxacin (Tabla II.10).

Tabla II.10. Sensibilidades de los principales métodos de inhibición microbiológica suministrados por los fabricantes de los métodos rápidos

Antibiótico	BRT AiM	Charm B-Y	CMT Copan	Delvotest Accelerator	Delvotest SP-NT	Eclipse 50	Eclipse 100
Amoxicilina	100	86,7	100	96,7	83,3	96,7	96,7
Ampicilina	100	70	100	100	100	96,7	66,7
Cloxacilina	100	100	100	100	100	0	0
Dicloxacilina	100	100	100	80	100	100	100
Penicilina	100	100	100	100	100	100	100
Cefalexina	100	90	100	90	96,7	100	100
Cefalonio	100	100	100	76,7	100	100	100
Cefoperazona	100	100	100	100	100	100	56,7
Cefquinoma	0	100	0	0	0	0	0
Oxitetraciclina	0	53,3	0	0	0	0	0
Neomicina	100	100	50	100	0	0	100
Gentamicina	0	0	0	0	0	0	0
Eritromicina	0	100	0	0	0	0	0
Estreptomina	0	0	0	0	0	0	0
Kanamicina	0	0	0	0	0	0	0
Lincomicina	0	0	0	0	0	0	0
Enrofloxacin	0	0	0	0	0	0	0
Colistina	0	0	0	0	0	0	0

Fuente: Roca *et al.* (2008)

Se debe destacar que numerosos factores afectan a la sensibilidad de los métodos de screening empleados para detectar residuos de antibióticos en leche. Así, la sensibilidad del método BRT[®]AiM depende de la calidad y la cantidad del microorganismo de prueba presentes en el medio. Müller y Jones (1993), Nagel *et al.* (2009, 2010) destacan que una mayor concentración de microorganismos en el medio de cultivo

produce una disminución en la sensibilidad de los métodos, mientras que una disminución de esporas produce un aumento en la sensibilidad del método.

En leche de otras especies, Althaus *et al.* (2002) destacan que el método Delvotest[®] “SP” posee una sensibilidad del 100% para los residuos de amoxicilina, ampicilina, cloxacilina, ceftiofur[®], penicilina “G”, tilosina y sulfametoxazol en leche de oveja, mientras que la sensibilidad disminuye para sulfadiazina (73,3%) y sulfametoxipiridazina (43,3%) (sulfametoxypridazine). Este método no posee sensibilidad para detectar residuos de tetraciclinas y aminoglucósidos en leche.

En forma similar, Althaus (1999) observa que el método BRT[®] AiM presenta en leche de oveja sensibilidades del 100% para los residuos de amoxicilina, ampicilina, cloxacilina y penicilina, disminuyendo para el ceftiofur[®] (70%) y tilosina (10%). El método no posee sensibilidad para detectar residuos de aminoglucósidos tetraciclinas y sulfamidas en leche de oveja.

II.4.1.2.1. Resultados falsos violativos en los métodos de screening: Cualquier metodología analítica de screening debe cumplir con los requisitos de presentar buena sensibilidad, precisión y reproducibilidad, además de brindar bajos porcentajes de resultados falsos positivos, falsos negativos y falsos violativos. Por ello, la metodología de screening debe ser capaz de otorgar una respuesta rápida a un nivel no inferior a su LMR para evitar al rechazo de la leche por parte de la empresas, debido a resultados falsos violativos (Moats *et al.*, 2000; Schneider *et al.*, 2009; Salter *et al.*, 2006).

En este sentido, un método de screening ideal debe proporcionar solamente respuestas positivas cuando los analitos están presentes a niveles lo más cercanos posibles a los valores de Límites Máximos de Residuos (CEE) o Tolerancias (EEUU) establecido por la legislación de cada país (Moats *et al.*, 2000). Por ello, en EEUU, la Food and Drug Administration (1996) definió con el nombre de “resultados violativos” a

aquellas respuestas positivas a los métodos de detección de residuos de antibióticos en la leche que contienen residuos por debajo de los niveles de tolerancia.

De esta manera, las muestras que infrinjan los niveles legales pueden ser detectadas sin necesidad de realizar otros análisis posteriores (Schneider *et al.*, 2009). En efecto, los resultados falsos violativos pueden conducir a posteriores análisis de laboratorios que resultan muy costosos, tales como HPLC-MS-MS e innecesarios.

Además, los resultados falsos violativos pueden ocasionar pérdidas económicas a la empresas lácteas, al rechazar muestras totalmente aceptables desde el punto de vista de la legislación, además de aplicar sanciones injustas a productores que entregan la leche a niveles inferiores a los LMRs o Tolerancias (Schneider y Lehotay, 2008).

Riediker *et al.* (2001) señalan que los métodos Delvotest[®] “SP” y Beta Star[®] pueden otorgar resultados falsos violativos para muestras que contienen residuos de cloxacilina y penicilina a niveles inferiores a sus LMRs, luego de haber cuantificado en forma inequívoca sus concentraciones por técnica HPLC-MS. Destacan además, que los métodos de cribado dan una respuesta positiva en caso que dos analitos estén presentes en una única muestra, cada uno de ellos a niveles inferiores a sus respectivos LMRs, puesto que estarían manifestando un efecto sinérgico en los métodos de screening.

También, Salter *et al.*(2006) destacan resultados falsos violativos cuando emplean el test ROSA Charm[®] para la detección de residuos de Aflatoxina M1 en leche a niveles inferiores (desde 350 µg/l hasta 450 µg/l) a la tolerancia (500 µg/l) establecido por la legislación. En forma similar, Schneider y Lehotay (2006) señalan la presencia de resultados falsos violativos para muestras de músculo de pollo que contenían residuos de oxitetraciclina y tetraciclina a niveles inferiores al LMRs cuando utilizan un método de fluorescencia con lectura 505 nm y excitación a 385 nm.

II.4.1.3. Reproducibilidad de los métodos de screening: Estudios de validación colaborativa: Para que un método de screening pueda considerarse “fiable”, resulta necesario que los resultados obtenidos en diferentes laboratorios encargados del control de calidad resulten equivalentes. Por ello, se define la reproducibilidad como la repetibilidad entre los resultados de análisis independientes obtenidos en equivalentes condiciones, es decir, con el mismo método sobre idéntico material problema, realizadas en diferentes laboratorios, con diferentes técnicos, equipos e instalaciones (CEE, 1993).

Según la Guía 183 de IDF-FIL (2002), para realizar estudios de validación colaborativa, se deben preparar muestras de leche (controles negativos) fortificadas artificialmente con diversos antibióticos (procedentes de laboratorios certificados, especificando el grado de pureza de las sustancias patrones) para los cuales se desea validar el método. Las muestras de leche deben remitirse acompañadas con los métodos a validar, a una cantidad mínima de 15 laboratorios. Cada muestra codificada, debe analizarse (10 a 20 réplicas) en cada laboratorio participante. Cada laboratorio debe seguir un estricto protocolo experimental de trabajo suministrado por la casa fabricante.

En un trabajo realizado por Suhren y Heeschen (1994) con el propósito de evaluar los resultados de los métodos Charm[®] AIM-96, Delvotest[®] SP y BRT[®] AiM obtenidos en 9 laboratorios interprofesionales, remitieron muestras con diferentes concentraciones de oxitetraciclina, sulfadimidina, sulfadimetoxina, gentamicina y espiramicina. Dichos autores encuentran diferencias en la sensibilidad de los métodos debido a problemas asociados a la estabilidad de las disoluciones patrones de leche. Se concluye que el método Delvotest[®] SP es apropiado para detectar oxitetraciclina y sulfadimidina, mientras que el método Charm[®] AIM-96 resultó muy sensible para la gentamicina.

En otro estudio colaborativo, Suhren (1995) analiza la reproducibilidad de los métodos BRT[®] AiM, Delvotest[®] SP y Penzym[®] a partir de diferentes laboratorios lactológicos. El 80% de los laboratorios señalaron resultados positivos al BRT[®] AiM para 4

$\mu\text{g/l}$ de penicilina (LMR) y el 100% para 10 $\mu\text{g/l}$ de este antibiótico, mientras que tetraciclina debía estar presente a 1000 $\mu\text{g/l}$ para que el 100% de los laboratorios pudiesen detectarla. En cuanto al método Delvotest[®] SP, el 100% de los laboratorios otorgaron resultados positivos para concentraciones de 6 $\mu\text{g/l}$ de penicilina y 1000 $\mu\text{g/l}$ de tetraciclina. Respecto al método Penzym[®], el 100% de los laboratorios indicaron resultados positivos a 10 $\mu\text{g/l}$ de penicilina (Suhren, 1995).

Suhren y Beukers (1998) llevaron a cabo un estudio de validación colaborativo en el cual participaron 30 laboratorios pertenecientes a 17 países de Europa para evaluar la reproducibilidad del método Delvotest[®] SP en la detección de residuos de cloxacilina (0, 15, 22,5, 30 y 45 $\mu\text{g/l}$) y sulfametoxazol (0, 12,5, 25, 50, 75 y 100 $\mu\text{g/l}$) en muestras de leche. Las muestras fortificadas con 30 $\mu\text{g/l}$ de cloxacilina (LMR) y 100 $\mu\text{g/l}$ de sulfametoxazol (LMR) resultaron positivas en el 100% de los casos, mientras que aquellas con 15 $\mu\text{g/l}$ (0,5 LMR) de cloxacilina y 50 $\mu\text{g/l}$ (0,5 LMR) de sulfametoxazol presentaron un 52,9% y 98,6% de resultados positivos, respectivamente.

El Instituto Nacional de Tecnología Industria (INTI Lácteos, Argentina) llevó a cabo una validación colaborativa del método ResScreen[®] con la participación de 18 laboratorios de control de calidad de productos lácteos, algunos de los cuales no disponían de experiencia previa en el uso del método de inhibición microbiológica (INTI-UNL, 2010). La Tabla II.11 resume las frecuencias de resultados positivos informadas por los laboratorios.

Los residuos de penicilina (94,4%) y oxacilina (100%) son detectados por ambos bioensayos a niveles equivalentes a sus LMRs, mientras que oxitetraciclina (61,1%) y sulfatiazol (77,8%) no llegan a detectarse por la totalidad de los laboratorios a niveles del LMR por estos bioensayos. Las discrepancias se pueden atribuir a la falta de experiencia en el manejo del método y a problemas asociados al tiempo transcurrido en la remisión de las muestras. En ningún caso oxitetraciclina fue detectada por el método BS, tampoco

sulfatiazol por el método BT, señalando un adecuado sistema para la identificación de estos antibióticos mediante el empleo de ambos bioensayos.

Tabla II.11. Resultados del estudio de validación colaborativa del sistema ResScreen®

Antibiótico	Concentración	ResScreen® "BT"		ResScreen® "BS"	
		Positivo*	Negativo*	Positivo*	Negativo*
Blanco	-	0	100	0	100
Penicilina	4	94,4	5,6	94,4	5,6
Oxacilina	30	100	0	100	0
Oxacilina	60	100	0	100	0
Oxitetraciclina	100	61,1	38,9	0	0
Oxitetraciclina	200	83,3	16,7	0	0
Sulfatiazol	100	0	0	77,8	22,2
Sulfatiazol	200	0	0	83,3	16,7

* Resultados expresados en frecuencia relativa de los 18 laboratorios participantes. INTI-UNL (2010).

II.4.1.4. Estudios de robustez interna y externa de los métodos de screening. Según la Decisión 657 de la Comunidad Económica Europea (CEE, 2002), la robustez de un método analítico se define como la susceptibilidad que posee a los cambios en las condiciones experimentales, que depende de los materiales de la muestra, los analitos, las condiciones de almacenamiento, las condiciones ambientales y/o la preparación de la muestra. Por ello, se sugiere que deberán indicarse cualquier variación de las condiciones experimentales susceptibles de una fluctuación, como por ejemplo, estabilidad de los reactivos, composición de la muestra, pH o temperatura.

De este modo, la robustez de un método es la medida de su capacidad para que sus resultados no se afecten por pequeñas variaciones deliberadas en el método. Dicho parámetro indica un aspecto de la veracidad o fiabilidad del método durante su uso en condiciones normales. En un plano teórico, ningún método de análisis debe mostrar

importantes diferencias en sus resultados cuando se producen pequeños cambios o perturbaciones en las condiciones experimentales.

La Comisión Europea, al describir el empleo de métodos analíticos y la interpretación de los resultados, utiliza el término “robustez” cuando se refiere a “la susceptibilidad del método frente a los cambios en las condiciones experimentales”. Esta propiedad se evalúa mediante la introducción de pequeñas variaciones en el tratamiento previo de la muestra, extracciones, recuperación, etc. En una segunda etapa de la validación se incluyen características intrínsecas del método de análisis, como por ejemplo la evaluación de los cambios en los resultados debidos a diferentes condiciones de muestreo, matrices, especies, etc.

Las capacidades de detección de los métodos, pueden verse afectadas por diversos factores, como los diferentes lotes de producción. Para evaluar estas diferencias, IDF-FIL (2002) recomienda llevar a cabo estudios para evaluar la variación en las respuestas de los métodos debido a factores propios de la fabricación, como por ejemplo, nivel del indicador, concentración de nutrientes en el medio de cultivo, concentración de esporas, volumen del medio de cultivo, período de almacenamiento, etc.

Otros factores inherentes al uso del método, también pueden afectar a su respuesta. Así, por ejemplo, Luitz y Suhren (1995a,b) y Nagel (2009) señalan que la prolongación en el tiempo de incubación de un método microbiológico produce una disminución en la sensibilidad de algunos antimicrobianos presentes en la leche.

El tiempo de incubación también influye sobre la respuesta del método BRT[®] AiM. Molina *et al.* (1999) observan una disminución en la frecuencia de casos positivos cuando muestras de leche de cabra conservadas con azidiol, se analizan a las 4 horas de incubación en lugar de las 3 horas recomendadas por la casa fabricante.

Para el Delvotest[®] SP, Reybroek (1995a,b) indica que la sensibilidad es mucho más elevada cuando la lectura se realiza en el momento que se produce el cambio de

color (amarillo) de la muestra testigo o “negativa”, que cuando se efectúan las interpretaciones después de un tiempo de incubación de la cada fabricante (3 horas).

El período de almacenamiento de las placas del método BRT[®] AiM afecta a sus lecturas fotométricas. Luitz y Suhren (1995a,b) observan que las capacidades de detección de la penicilina disminuyeron mientras que para la oxitetraciclina aumentaron conforme lo hacía el tiempo de almacenamiento (20 semanas a 6 °C).

Con respecto a las herramientas estadísticas empleadas en los estudios de robustez, se destaca el uso del análisis factorial completo (Aguilera *et al.*, 2006, Trullols, 2006). Estos autores consideran que la robustez puede evaluarse durante o al final de la etapa del desarrollo de una técnica analítica.

Recientemente, Nagel *et al.* (2009b) proponen la implementación de técnicas estadísticas en la fase del “diseño experimental”, mediante la aplicación de un “diseño robusto” que contempla los factores de diseño (propios de la elaboración del método) y los factores de ruido (característicos del usuario del método). De este modo, los factores de ruido pueden ser analizados y controlados estadísticamente antes de elaborar un método, a fin de disminuir la variabilidad de la respuesta de un bioensayo.

II.4.1.5. Capacidad de detección de los métodos de screening: El límite de detección (LD) se define como “*el menor contenido a partir del cual resulta posible deducir la presencia de sustancias analizadas con seguridad estadística razonable*” (CEE, 1993). La norma ISO/FDIS 13969 (IDF-FIL, 2002) establece un lineamiento para la determinación de los principales parámetros de calidad de los métodos microbiológicos para la detección de inhibidores, incluyendo el LD.

Actualmente, la Decisión 657 de la CEE (CEE, 2002) define a la “capacidad de detección (CD_{α})” como “*el límite por encima del cual la muestra se considera como no confiable con una probabilidad de error $\alpha=0,05$* ”. En efecto, la capacidad de detección es

la concentración mínima en la que un método puede detectar muestras realmente contaminadas con una certeza estadística de $(1-\alpha)$. Para métodos de cribado se emplea un coeficiente $\alpha=0,05$, es decir, se trabaja con un error porcentual del 5%.

En primer lugar se debe garantizar la calidad de la leche que se empleará para preparar las disoluciones fortificadas. Al respecto, IDF-FIL (2002) destaca que las muestras de leche "control negativo" deben provenir de vacas que cumplan los siguientes requisitos:

- Buen estado de salud clínica y subclínica, con especial énfasis en salud de las ubres (menos de 150000 cél/ml), libre de sustancias antimicrobianas o alimentación con antibióticos desde al menos 8 semanas antes de la recolección de leche,

- Encontrarse a mitad de su período de lactación (>60 días y <200 días del destete) y tener una producción superior a los 5 kg leche por día,

- Recuento bacteriológico inferior a 10^4 ufc/ml (antes del proceso de preservación: congelado, liofilización, etc.).

Para la construcción de la curva dosis-respuesta, IDF- FIL (2002) establece que deben ensayarse al menos cuatro concentraciones diferentes entre el control negativo y la concentración que se espera resulte positiva, las cuales deben distribuirse en forma equidistante entre ellas según una escala lineal o logarítmica. Además, debe incluirse una concentración que sea al menos 1,5 a 2 veces superior al valor positivo esperado y una concentración equivalente al LMR del antibiótico. Para cada concentración de antibiótico, deben testearse 10 a 20 réplicas cuando se efectúan calificaciones visuales, sin embargo, en caso de utilizar lectores ópticos, el número de replicas se disminuye a 3-5.

A continuación, se calcula las frecuencias relativas de resultados positivos para cada concentración de antibiótico y se construye la curva dosis-respuesta. La capacidad

de detección (CC_{α}) se calcula como “la concentración que corresponde a la intersección de la curva dosis respuesta con la línea que representa el 95% de resultados positivos”.

En Tabla II.12 se muestran los valores de CC_{α} reportados por las casas fabricantes de los métodos microbiológicos BRT[®] AiM, Charm Blue Yellow, Delvotest[®] y Eclipse[®].

Althaus *et al.* (2002, 2003), Molina *et al.*, (2003), Montero *et al.* (2005), Linage *et al.* (2007) sugieren calcular la CC_{α} modelando la curva “dosis-respuesta” utilizando el modelo de regresión logístico y calcular a partir de dicha curva la CC_{α} según el criterio del 95% de resultados positivos. En caso de emplearse lecturas fotométricas, la CC_{α} se calcula como la concentración que produce el 45% de la máxima absorbancia relativa porcentual (Luitz y Suhren, 1995a,b; Luitz *et al.*, 1995; Schliephake, 1996).

Diferentes autores (Bishop *et al.*, 1985; Müller y Jones, 1993; Charm y Ruth, 1993; Heeschen, 1993; Máyra-Makinen, 1993; Reybroek, 1994; Hozova y Greifová, 1995; Reybroek, 1995a,b; Althaus *et al.*, 2001a,b, 2002, 2003; Molina *et al.*, 2003) han estudiado las CC_{α} de los métodos utilizando aquellos antibióticos y sustancias antimicrobianas más empleadas en los tratamientos del ganado vacuno.

En general, se puede establecer que las capacidades de detección de los métodos microbiológicos son buenas para los antibióticos betalactámicos y sulfamidas (exceptuando el Bioensayo BT que no es específico para sulfas). Para las tetraciclinas, los métodos Eclipse[®] 100ov y ResScreen[®] BT poseen buena capacidad de detección, mientras que los métodos Delvotest[®] SP-NT, Charm[®] Blue-Yellow y BRT[®] AiM poseen una sensibilidad media. Además pueden detectar eritromicina, tilosina y gentamicina.

Tabla II.12. Capacidades de detección α ($\mu\text{g/l}$) de sustancias antimicrobianas suministradas por los fabricantes de los métodos microbiológicos

Antibiótico	LMR	Delvotest [®] SP-NT	BRT [®] AiM	Eclipse 100 ov	Charm [®] BlueYellow	ResScreen [®]	
						BT	BS
<i>Betalactámicos</i>							
Benzilpenicilina	4	1-2	-	4	3-4	3	3
Ampicilina	4	4	2-3	4	5	7	4
Amoxicilina	4	2-3	2-3	5	5-6	8	5
Oxacilina	30	10	5-10	25	-	17	16
Cloxacilina	30	20	10-20	-	30-50	42	40
Dicloxacilina	30	10	10-20	-	-	-	-
Nafcilina	30	-	10-15	-	-	-	-
Cefapirina	60	4-6	3-4	8	10	-	-
Ceftiofur	100	25-50	70-100	-	50-100	105	115
Cefoperazona	50	-	20-30	-	-	62	94
Cefalexina	100	-	-	75	-	99	160
Cefalonio	20	-	-	-	-	-	-
Cefazolina	50	-	20-25	-	-	-	-
Cefquinoma	20	-	40-60	-	-	-	-
<i>Tetraciclinas</i>							
Tetraciclina	100	250-500	-	150	-	158	720
Oxitetraciclina	100	250-500	500-750	100	300	150	850
Clortetraciclina	100	-	-	-	-	275	3600
<i>Sulfamidas</i>							
Sulfametazina	100	25-100	-	200	-	-	-
Sulfadimetoxina	100	-	-	-	50	12000	260
Sulfatiazol	100	-	50-100	75	-	13000	100
Sulfadiazina	100	25-50	-	-	-	49000	164
<i>Macrólidos</i>							
Eritromicina	40	40-80	25-40	300	-	210	190
Espiramicina	200	400-600	150-200	1000	-	3400	2600
Tilosina	50	30	20-50	80	75-100	74	50
<i>Aminoglucósidos</i>							
Gentamicina	100	50	100-200	500	300-400	320	530
Neomicina	1500	100-200	300-400	1500	-	600	1200
Kanamicina	150	-	-	6000	-	5600	6200
DH/Estreptomicina	200	-	750-1000	2500	-	2300	3600
<i>Otros</i>							
Trimetoprim	50	50-100	-	-	-	-	-
Dapsona	0*	0,5-1	-	-	-	-	-

*Sustancias prohibidas (Reglamento 2377/90), las capacidades corresponden con el tiempo de viraje del control negativo (control time).

II.4.1.5.1. Empleo de un lector fotométrico para la interpretación de los resultados: Los métodos de inhibición microbiológica fueron diseñados para efectuar lecturas visuales, sin embargo, algunos laboratorios lactológicos o centros de investigación han automatizado las lecturas de las placas mediante el uso de un lector óptico o fotométrico,

puesto que los cambios de color del indicador presente en el medio de cultivo (púrpura de bromocresol o negro brillante) se corresponden con cambios de la absorbancia a determinados valores de longitudes de onda.

Estas lecturas fotométricas se efectúan a diferentes longitudes de onda, incluso se pueden llevar a cabo determinaciones duales a la longitud de onda donde absorbe el indicador y a una longitud de referencia. Por ello, en la Tabla II.13 se resumen las longitudes de onda empleadas por diferentes autores para los métodos BRT[®] AiM y Delvotest[®] "SP". Las lecturas se efectúan a 450 o 550 nm, mientras que la referencia se realiza a longitudes de onda comprendidas entre 620 y 690 nm.

Tabla II.13. Longitudes de onda utilizadas para las interpretaciones fotométricas de métodos microbiológicos para la detección de antibióticos en leche

Autores	Método	Longitud de onda (nm)	
		Medición	Referencia
Althaus (1999)	BRT [®] AiM-Delvotest [®] SP	450 - 590	650
Althaus et al. (2002)	BRT [®] AiM	450 - 590	650
Althaus et al. (2003)	Delvotest [®] SP	590	650
Adriany (1996)	BRT [®] AiM	450	620
Frank (1995)	BRT [®] AiM	460	620
Hass (1995)	BRT [®] AiM	450	630
Luiz y Suhren (1995 _{a,b})	BRT [®] AiM	550	690
Schliephake (1996, 1998)	BRT [®] AiM	405	---
Schiffmann et al. (1992)	BRT [®] AiM	570	---
Suhren (1995)	BRT [®] AiM	550	690
Zorraquino (1997b)	BRT [®] AiM	550	650

Cuando se emplea un lector fotométrico para estudiar las curvas dosis respuestas, se pueden calcular las capacidades de detección de cada fármaco utilizando absorbancias relativas porcentuales. En tal caso, diferentes autores calculan la capacidad de detección como la concentración del antibiótico que produce un 45% de la máxima absorbancia relativa porcentual (Luitz, 1995a,b; Luitz *et al.*, 1995; Schliephake, 1996; Suhren, 1995; Althaus, 1999; Althaus *et al.*, 2002, 2003).

Althaus *et al.* (2002) señala que las capacidades de detección del método BRT[®] AiM no coinciden según se trabaje con curvas dosis respuestas construidas a partir de datos categóricos (positivo y negativo) o con absorbancias relativas porcentuales. También observan diferencias en las capacidades de detección calculadas para diferentes longitudes de onda. A modo de ejemplo, Tabla II.14 expone las capacidades de detección de antibióticos betalactámicos del método BRT[®] AiM para interpretaciones visuales y lecturas ópticas duales a 450-650 nm y 590-650 nm.

Tabla II. 14. Capacidades de detección de antibióticos betalactámicos en leche para diferentes lecturas del método BRT[®] AiM

Betalactámico	Interpretación Visual	Lecturas fotométrica	
		450-650 nm	590-650 nm
Amoxicilina	6	4	4
Ampicilina	6	7	6
Cloxacilina	51	22	26
Cefadroxilo	230	150	140
Cefalosporina C	1330	780	770
Cefalexina	270	180	170
Cefoperazone	92	49	51
Ceftiofur [®]	120	83	88
Cefuroxime	69	53	51
Penicilina "G"	2	2	2

Fuente. Althaus *et al.* (2002).

Estos autores establecen que las capacidades de detección para diferentes antibióticos calculadas a partir de lecturas fotométricas resultan inferiores a los determinados en forma visual. Además, concluyen que estas diferencias se pueden atribuir a los diferentes criterios empleados en los cálculos de las capacidades de detección, según se efectúen lecturas visuales (criterio del 95% de las frecuencias de resultados positivos) o lecturas fotométricas (criterio del 45% de la máxima absorbancia relativa).

III. OBJETIVOS

Debido a los inconvenientes que se pueden ocasionar por las interpretaciones visuales del sistema microbiológico ResScreen® para la detección e identificación de residuos de antimicrobianos en la leche, el presente trabajo tiene como objetivo evaluar la implementación de un lector fotométrico para el análisis de los resultados de este sistema de screening, con el propósito de evitar apreciaciones subjetivas en las interpretaciones de los resultados. Para el logro de este propósito se han propuesto dos objetivos específicos:

- Establecer los puntos de corte (*“cut off”*) para los bioensayos ResScreen® “BT” y “BS” haciendo uso de un lector fotométrico y herramientas quimiométricas adecuadas a fin de automatizar las lecturas de los resultados y evitar posibles errores debido a las interpretaciones visuales de tipo subjetivas.

- Determinar los límites de detección para 30 antibióticos en leche para el sistema microbiológico ResScreen®, haciendo uso de los valores de *“cut off”* calculados en el objetivo anterior y de las curvas dosis-respuesta confeccionadas a partir de las lecturas de absorbancias obtenidas con un lector fotométrico de microplacas ELISA.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1. Materiales

Los equipos, reactivos y materiales utilizados para la elaboración de los bioensayos fueron los que se indican a continuación:

- ✓ Balanza analítica de precisión 0.0001 g (Scientech SA120, USA)
- ✓ Balanza sensibilidad 0.001 g (Scientech SP150, USA)
- ✓ Agitador magnético (Cole-Parmer Instrument Company USA, Model 4803-02)
- ✓ Baño termostático (Dalvo Model MAI4, Argentina)
- ✓ NaOH (Cicarelli[®], Argentina, Ref 893214)
- ✓ HCl 36.5% (Cicarelli[®], Argentina, Ref. 918110)
- ✓ Microplacas ELISA estériles de fondo "U" Deltalab[®] (España).
- ✓ Micropipetas automáticas regulables de 10 μ l, 50 μ l, 200 μ l y 1000 μ l marca Boeco[®] (Alemania)
- ✓ Dosificador electrónico repetitivo multicanal (8 canales) Eppendorf Research[®] Pro (Alemania)
- ✓ Frascos de vidrio de borosilicato autoclavables Boeco[®] (Alemania)
- ✓ Tubos falcon para centrifuga de 50 ml Biologix (Argentina)

Además se empleó el material habitual del laboratorio (guantes de látex, pesa sustancias, viales eppendorf, probetas, matraces aforados, erlenmeyers, espátulas, pipetas de vidrio, etc.).

IV.2. Sistema microbiológico RESSCREEN[®]

El sistema ResScreen[®] consta de dos Bioensayos BT (betalactámicos y tetraciclinas) y BS (betalactámicos y sulfamidias). La combinación de dos bioensayos ha

sido optimizada para la detección e identificación de residuos de antibióticos betalactámicos (Nagel *et al.*, 2009b), tetraciclinas (Nagel *et al.*, 2009a) y sulfamidas (Nagel *et al.*, 2009c) en la leche. Esta ventaja adicional de poder identificar tres familias de antimicrobianos se logra empleando ambos métodos en forma simultánea.

El principio del método se basa en la inhibición del crecimiento de *G. stearothermophilus* subsp. *calidolactis* cuando la leche posee residuos de antimicrobianos. En el caso que la leche esté libre de antimicrobianos, se producirá el crecimiento del microorganismo acompañado de un cambio en la coloración de los indicadores de los Bioensayos BT (de púrpura a amarillo) y BS (de negro a amarillo). Por el contrario, la presencia de ciertos antibióticos no producirá cambios en los colores originales de algunos de los dos métodos.

En caso que se desea investigar la naturaleza del antibiótico presente en una muestra de leche incógnita, se procede al análisis de dicha muestra mediante ambos bioensayos, la interpretación se efectúa según la Tabla IV.1 (Nagel, 2009).

Tabla IV.1. Interpretación de los resultados mediante la aplicación simultánea de los bioensayos BT y BS

Antimicrobianos	Resultado	
	Bioensayo "BT"	Bioensayo "BS"
Betalactámicos	+(*)	+(*)
Tetraciclinas	+	-
Sulfamidas	-	+
Ausencia o no detectable	-	-

(*) Pueden presentarse interferencias debido a neomicina, lincomicina o tilosina.

Las muestras de leche que contiene residuos de betalactámicos producirán resultados positivos a ambos bioensayos, las muestras que contengan residuos de penicilinas ocasionarán resultados positivos al bioensayo BT y negativos a bioensayo BS,

mientras que las muestras de leche que contengan sulfamidas darán respuestas positivas al bioensayo BS y negativas al bioensayo BT. En caso que las muestras de leche estén libres de residuos, se producirá el desarrollo del microorganismo en ambos microtubos (resultados negativos).

IV.3. Disoluciones de Fármacos y muestras fortificadas.

Para el cálculo de las capacidades de detección de los diferentes bioensayos, se utilizaron 30 agentes antimicrobianos (10 betalactámicos, 4 aminoglucósidos, 4 macrólidos, 4 quinolonas, 3 tetraciclinas y 5 sulfonamidas) empleados en los tratamientos veterinarios del ganado vacuno, que se detallan en la Tabla IV.2.

En el estudio de las capacidades de detección de estos fármacos, se prepararon disoluciones en el momento de efectuar los análisis, que fueron utilizadas dentro de las dos horas posteriores a su elaboración, a fin de evitar cualquier desvanecimiento debido al tiempo y/o por la acción de la luz.

Para la preparación de las diluciones se pesó en una balanza analítica, 0.0100g de cada sustancia (teniendo en cuenta la pureza informada por el fabricante), y se disolvió en un matraz de 10 ml utilizando el disolvente más adecuado para cada sustancia (Tabla IV.3). De esta manera se obtuvieron las disoluciones madre o “stock” con una concentración de 1000 mg/l. A partir de esta “disolución stock” de cada antibiótico se prepararon disoluciones que correspondían 100, 10 y 1 mg/l.

Las muestras fortificadas de leche, se prepararon en matraces aforados de 10 ml. Para cada caso se tomó, con ayuda de una micropipeta, la cantidad necesaria de las disoluciones de antibiótico preparadas anteriormente (100, 10 y 1 mg/l, “stock”), siguiendo las recomendaciones de la IDF-FIL (IDF-FIL, 1997, 2002), donde se indica que el volumen de las disoluciones empleadas para fortificar a las muestras de leche no debe superar el 1% del volumen de disolución final.

Tabla IV.2. Antibióticos utilizados en el diseño y validación de los bioensayos

Antibiótico	Solubilidad	Marca	Código	Fórmula
<i>Betalactámicos</i>				
Penicilina G	H ₂ O	Sigma	PEN-Na	C ₁₆ H ₁₇ N ₂ O ₄ SNa
Amoxicilina	H ₂ O	Sigma	A-8523	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₅ S
Ampicilina	H ₂ O	Sigma	A-9518	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₄ S
Cloxacilina	H ₂ O	Sigma	C-9393	C ₁₉ H ₁₇ ClN ₃ O ₅ SNa
Oxacilina	H ₂ O	Sigma	O-1002	C ₁₉ H ₁₈ N ₃ O ₅ SNa.H ₂ O
Cefadroxil	H ₂ O	Sigma	C-7020	C ₁₆ H ₁₇ N ₃ O ₅ S
Cefalexina	H ₂ O	Sigma	C-4895	C ₁₆ H ₁₇ N ₃ O ₄ S
Cefoperazone	H ₂ O	Sigma	C-4292	C ₂₅ H ₂₆ N ₉ O ₈ S ₂ Na
Cefuroxime	H ₂ O	Sigma	C-4417	C ₁₉ H ₁₇ N ₅ O ₇ S ₃
Ceftiofur [®]	H ₂ O	Pharmacia & Upjohn ^a		C ₁₆ H ₁₅ N ₄ O ₈ SNa
<i>Aminoglucósidos</i>				
Gentamicina	H ₂ O	Sigma	G-3632	C ₂₁ H ₄₃ N ₅ O ₇
Kanamicina	H ₂ O	Sigma	K-4000	C ₁₉ H ₃₆ N ₄ O ₁₁ .H ₂ SO ₄
Neomicina	Fosfato pH=8	Sigma	N-1876	C ₂₃ H ₄₆ N ₆ O ₁₃ .3H ₂ SO ₄
Estreptomina	H ₂ O	Sigma	S-6501	(C ₂₁ H ₃₉ N ₇ O ₁₂) ₂ .3H ₂ SO ₄
<i>Macrólidos</i>				
Eritromicina	Metanol	Sigma	E-6376	C ₃₇ H ₆₇ NO ₁₃
Espiramicina	Fosfato pH=8	Sigma	S-9136	C ₄₃ H ₇₄ N ₂ O ₁₄
Lincosamina	Metanol	Sigma	L-6004	C ₁₈ H ₃₄ N ₂ O ₈ S.HCl
Tilosina	Metanol	Sigma	T-6134	C ₄₆ H ₇₇ NO ₁₇
<i>Quinolonas</i>				
Ciprofloxacina	NaOH 0.1 N	Fluka	17850-F	C ₁₇ H ₁₈ F ₃ N ₃ O ₃
Enrofloxacin	NaOH 0.1 N	Bayer ^b	-	C ₁₉ H ₂₂ FN ₃ O ₃
Marbofloxacina	NaOH 0.1 N	Vetoquinol ^c	-	C ₁₇ H ₁₉ FN ₄ O ₄
Norfloxacina	NaOH 0.1 N	Sigma	N-9890	C ₁₆ H ₁₈ FN ₃ O ₃
<i>Sulfamidas</i>				
Sulfatiazol	H ₂ O	Sigma	S-0127	C ₉ H ₈ N ₃ NaO ₂ S ₂
Sulfametoxazol	H ₂ O	Sigma	S-7507	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₃ S
Sulfadimetoxina	H ₂ O	Sigma	S-7385	C ₁₂ H ₁₃ N ₄ NaO ₄ S
Sulfametazina	Metanol	Sigma	S-5637	C ₁₂ H ₁₃ N ₄ O ₂ SNa
Sulfadiazina	Metanol	Sigma	S-8626	C ₁₀ H ₁₀ N ₄ O ₂ S
<i>Tetraciclinas</i>				
Clortetraciclina	NaOH 0.1 N	Sigma	C-4881	C ₂₂ H ₂₃ ClN ₂ O ₈ .HCl
Oxitetraciclina	HCl 0.1 N	Sigma	O-5750	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₉ .HCl
Tetraciclina	HCl 0.1 N	Sigma	T-3258	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈ .HCl

^a Pharmacia & Upjohn Co., Kalamazoo, MI, USA; ^b Bayer Health Care Div. Animal Health, Monheim, Germany; ^c Vetoquinol SA - B.P. 189 - 70204 Lure cedex, France.

Para la preparación de las disoluciones de leche se utilizó leche libre de antibióticos obtenida a partir de animales individuales, no tratados ni medicamentados durante el experimento (Reichmuth *et al.*, 1997; IDF-FIL, 1997, 2002).

De cada uno de los fármacos, se prepararon 12 disoluciones (1 blanco de muestra sin la adición de antibiótico y 11 concentraciones). Las concentraciones empleadas varían para los diferentes bioensayos y se detallan en la Tabla IV.3.

IV.4. Curvas dosis-respuestas de los antimicrobianos

Para el estudio de las curvas dosis-respuesta de cada agente antimicrobiano, se emplearon una microplaca BT y BS (30 microplacas por cada bioensayo). Se ensayaron 8 réplicas de cada una de las 12 concentraciones detalladas en la Tabla IV.3. Para ello, en cada pocillo de las microplacas, se depositó un volumen de 50 μ l de disolución de leche previamente enriquecida con el antibiótico a estudiar. Seguidamente, los bioensayos se colocaron 1 hora a 4°C para que tenga lugar la difusión de los antibióticos desde la leche hacia el medio agarizado. A continuación, la leche se retiró de cada pocillo por lavado de las microplacas con agua destilada, repitiendo esta operación tres veces. Las microplacas se sellaron con bandas adhesivas y se colocaron a incubar en baño flotante de 64°C durante 3 horas (Bioensayo BT) y 4 horas (Bioensayo BS).

IV. 5. Análisis estadísticos de los resultados

IV.5.1. Determinación del *cut off* de los Bioensayos BT y BS

Los resultados procedentes de las curvas dosis-respuestas se analizaron con un lector de microplacas ELISA marca Biotek ELx800™ (Biotek®, Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA) empleando filtro de 550 nm.

Tabla IV.3. Concentraciones de antimicrobianos utilizadas para determinar las capacidades de detección del sistema ResScreen®

Antimicrobianos	ResScreen®	Concentrations (µg/l or *mg/l)
<i>Beta-lactámicos</i>		
Amoxicilina	BT – BS	0, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14
Ampicilina	BT - BS	0, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14
Cloxacilina	BT – BS	0, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70
Oxacilina	BT - BS	0, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 25
Penicilina “G”	BT – BS	0, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 6, 8
Cefadroxil	BT – BS	0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 250
Cefalexina	BT - BS	0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 250
Cefoperazone	BT – BS	0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 250
Ceftiofur®	BT - BS	0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 250
Cefuroxime	BT – BS	0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 250
<i>Aminoglucosidos</i>		
Gentamicina	BT - BS	0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 800, 1000, 1200, 1400*
Kanamicina	BT – BS	0, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 7, 8*
Neomicina	BT - BS	0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2.0, 2.2*
Streptomina	BT – BS	0, 0.8, 1, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2, 2.5, 3, 4, 5
<i>Macrolidos</i>		
Eritromicina	BT - BS	0, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 800
Lincomicina	BT – BS	0, 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 1000
Tilosina	BT - BS	0, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 120, 140, 200, 300
Espiramicina	BT – BS	0, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 6, 7*
<i>Quinolonas</i>		
Ciprofloxacina	BT - BS	0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 6.0*
Enrofloxacin	BT – BS	0, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2.0, 2.2, 2.4, 3*
Marbofloxacina	BT - BS	0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0*
Norfloxacina	BT - BS	0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 7.0, 8.0, 10*
<i>Sulfamidas</i>		
Sulfadiazina	BT	0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60*
	BS	0, 20, 40, 60, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200
Sulfadimetoxina	BT	0, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16*
	BS	0, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 600, 800, 1000
Sulfametazina	BT	0, 15, 17.5, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60*
	BS	0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1.2*
Sulfametoxazol	BT	0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 15*
	BS	0, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 200, 250, 300, 400, 500
Sulfatiazol	BT	0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 15*
	BS	0, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 200, 250, 300, 400, 500
<i>Tetraciclinas</i>		
Clortetraciclina	BT	0, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35, 0.4, 0.45, 0.5, 0.6, 0.8*
	BS	0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 6*
Oxitetraciclina	BT	0, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 300, 400
	BS	0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 1, 1.2, 1.5*
Tetraciclina	BT	0, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 300, 400
	BS	0, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1.2, 1.5*

Además, se efectuaron interpretaciones visuales con tres profesionales entrenados para el análisis de respuestas dicotómicas de tipo colorimétrico. Se consideró como resultado aquel que produjo al menos dos coincidencias de las tres interpretaciones realizadas de cada muestra.

Posteriormente, se construyeron histogramas de frecuencias en función de las densidades ópticas (DO). Se analizaron los parámetros de simetría y curtosis para definir un posible comportamiento gauseano.

Para obtener un valor de *cut off* de cada bioensayo, se construyó la curva ROC (Receiver Operating Characteric) basada en las distribuciones binomiales de las poblaciones de muestras “positivas” y “negativas”. El objetivo fue seleccionar entre los distintos niveles de decisión o valores de corte (*cut off*), aquellos que permitan una mejor clasificación dicotómica de las densidades ópticas, según sean superiores o inferiores al valor elegido. Por ello, no se calculará un único par de valores de especificidad y sensibilidad que definan la exactitud del punto de corte, sino un conjunto de pares correspondientes a cada nivel de decisión.

En caso de disponer de dos curvas de distribución de frecuencias que corresponden a las muestras negativas y positivas (Figura IV.1), cuando se elige un valor arbitrario de punto de corte, se pueden calcular los valores de sensibilidad o frecuencia de verdaderos positivos (FVP) y la frecuencia de falsos positivos (FFP) como el valor de (1-especificidad). Estos valores se corresponderán respectivamente con el área a la derecha del *cut off* bajo la función de densidad de probabilidad de la población positiva y de la población negativa. La curva ROC (Figura IV.2) se obtiene representando los valores de la FVP (ordenadas) en función de los valores de la FFP (abscisas) para cada valor de *cut off*.

La curva ROC es una función creciente que refleja el compromiso existente entre la sensibilidad y la especificidad de un método, puesto que si se modifica el valor de *cut*

off para obtener una mayor sensibilidad, se disminuirá al mismo tiempo la especificidad y por el contrario, si se modifica el valor de *cut off* de modo talde mejorar la especificidad, se disminuirá la sensibilidad de la elección. En caso que ambas distribuciones de frecuencias (positivos y negativos) se encuentran prácticamente superpuestas, la curva de ROC no permitiera discriminar entre dichas poblaciones y la curva será la diagonal que une los vértices inferior izquierdo y superior derecho.

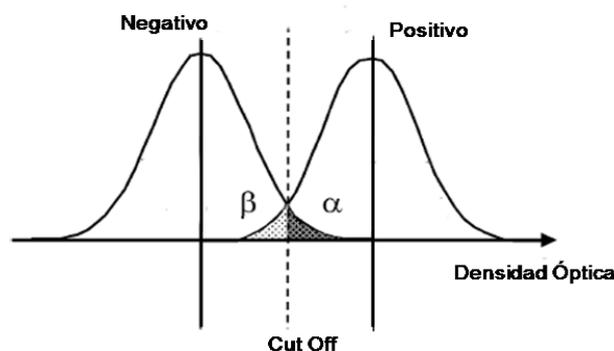


Figura IV.1. Errores α y β que se comenten cuando se elige un valor de *cut off* para diferenciar las muestras positivas y negativas

La exactitud de la prueba aumenta en la medida que la curva se desplaza desde la diagonal hacia el vértice superior izquierdo. Para el caso ideal de una discriminación perfecta (100% de sensibilidad y 100% de especificidad), la curva de ROC pasaría por dicho vértice.

El análisis de la curva de ROC proporciona una herramienta útil para seleccionar las condiciones óptimas en la toma de decisiones (como por ejemplo seleccionar el mejor *cut off*) de manera tal que de mejorar la relación “costo/beneficio” de un diagnóstico para la toma de decisiones.

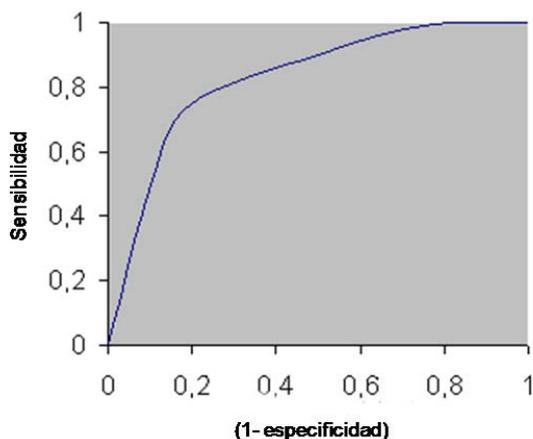


Figura IV.2. Curva ROC para un método de screening

Mediante la curva ROC, se determinaron los valores de *cut off* de densidad óptica (DO) para cada bioensayo de modo tal de maximizar la suma de la especificidad y la sensibilidad en cada caso. De este modo, se logra encontrar las condiciones de mayor poder de discriminación entre las densidades ópticas de las muestras positivas y negativas. Además, el área bajo la curva ROC se utilizó como una medida de la capacidad de discriminación del *cut off* para ambos métodos.

IV.5.2. Modelización de las curvas dosis-respuestas

Haciendo uso de las densidades ópticas, se calcularon las densidades ópticas relativas ($DO_{rel,x}$) efectuando una transformación de las densidades ópticas absolutas a una escala relativa según la siguiente expresión matemática:

$$DO_{rel,x} = \left(\frac{DO_x - DO_0}{DO_{100} - DO_0} \right) \quad (\text{Ecuación IV.1})$$

Donde: DO_0 = densidad óptica de las muestras de leche libre de agentes antimicrobianos, DO_{100} = densidad óptica de las muestras de leche fortificadas con una

concentración de antimicrobiano que impida el crecimiento de la bacteria-test, DO_x = densidad óptica de una muestra de leche fortificada antibiótico.

Las curvas dosis-respuesta para cada antibiótico se ajustaron mediante el procedimiento LOGISTIC contenido en el paquete estadístico SAS® (SAS, 2001):

$$L_{ij} = \text{logit} [F_{ij}] = \beta_0 + \beta_i [A_x]_i + \varepsilon_{ij} \quad (\text{Ecuación IV.2})$$

Donde: L_{ij} = modelo logístico; $[F_{ij}] = \text{logit} [Pp/(1-Pp)]$: probabilidad de “frecuencia positivos/frecuencias de negativos”); β_0, β_i = coeficientes estimados por el modelo de regresión logística, $[A]_i$ = efecto de la concentración de antibiótico en la leche, ε_{ij} = error residual del modelo.

IV.5.3. Cálculo de las capacidades de detección de los bioensayos BT y BS

Las capacidades de detección para cada antibiótico se calcularon como la concentración del fármaco que produce un 45% de la máxima densidad óptica relativa según el criterio establecido por Luitz (1995a,b), Luitz *et al.* (1995), Schliephake (1995), Suhren (1995) y Althaus *et al.* (2003).

Además, se propuso en este trabajo utilizar el valor de *cut off* absoluto (en término de DO) del bioensayo como un parámetro para el cálculo de las capacidades de detección de cada fármaco, puesto que este valor procede de maximizar los parámetros de “especificidad” y “sensibilidad” del método.

Para ello, se postuló el cálculo de la densidad óptica relativa porcentual de corte para cada antibiótico individual “i” ($DO_{\text{corte},i}$) utilizando los valores de DO de las muestras negativas ($DO_{0,i}$) y positivos ($DO_{100,i}$) según la siguiente expresión matemática:

$$DO_{corte,i} = \left(\frac{CutOff - DO_{0,i}}{DO_{100,i} - DO_{0,i}} \right) \cdot 100 \quad (\text{Ecuación IV.3})$$

Haciendo uso de estas densidades ópticas de cortes individuales calculadas para cada fármaco, se calculó el promedio de las densidades ópticas de corte DO_{corte} , según la ecuación:

$$\overline{DO}_{corte} = \frac{\sum_{i=1}^{i=n} DO_{corte,i}}{n} \quad (\text{Ecuación IV.4})$$

A partir de ese valor de este valor relativo de corte, que contempla a todos los antibióticos utilizados en el estudio, se definió la capacidad de detección como la concentración de antibiótico capaz de producir una densidad óptica que presenta mayor poder discriminante.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V.1. Determinación del *cut off* para los bioensayos BT Y BS

V.1.1. Estudios de las densidades ópticas de los Bioensayos BT y BS

La Tabla V.1 muestra los principales parámetros estadísticos para las densidades ópticas de las muestras “positivas” y “negativas” de ambos bioensayos. Para cada método, se observa que las medias de ambas poblaciones son diferentes, aunque los rangos se superponen en la región comprendida entre 0,7 y 1,0 unidades de absorbancias. Además, los coeficientes de simetría y curtosis presentan valores que están fuera del rango $[-2 ; 2]$, motivo por el cual no se puede considerar a las distribuciones de frecuencias como normales.

En forma similar Bioensayo BS presenta una zona de superposición de las densidades ópticas que esta comprendida entre 0,523 y 0,830 unidades. Las distribuciones de frecuencias de ambas poblaciones no son simétricas, con coeficientes de simetría $(-3,6969; -7,7258)$ y curtosis $(-2,8624; -5,6898)$ tipificados que están fuera del rango $[-2 ; 2]$ en las muestras negativas y positivas.

Tabla V.1. Parámetros estadísticos de las densidades ópticas (550 nm) del sistema ResScreen®

Parámetro Estadístico	Bioensayo BT		Bioensayo BS	
	Negativo ⁽¹⁾	Positivo ⁽²⁾	Negativo ⁽³⁾	Positivo ⁽⁴⁾
Media	0,654	1,122	0,738	1,105
Varianza	0,012	0,032	0,006	0,027
Desviación Standard	0,110	0,180	0,076	0,162
Rango	0,448-1,003	0,701-1,506	0,523-0,908	0,830-1,498
Asimetría tipificado	4,7282	05983	-3,6969	-7,7258
Curtosis tipificado	-5,1162	-6,2482	-2,8624	-5,6898

⁽¹⁾ : n: 1432; ⁽²⁾ : n: 1714; ⁽³⁾ : n: 1327; ⁽⁴⁾ : n: 1649.

Por ello, en las Figura V.1 (Bioensayo BT) y Figura V.2 (Bioensayo BS) se presentan las distribuciones de frecuencias para los valores de densidades ópticas de las muestras clasificadas como “positivo” y “negativo” en ambos métodos.

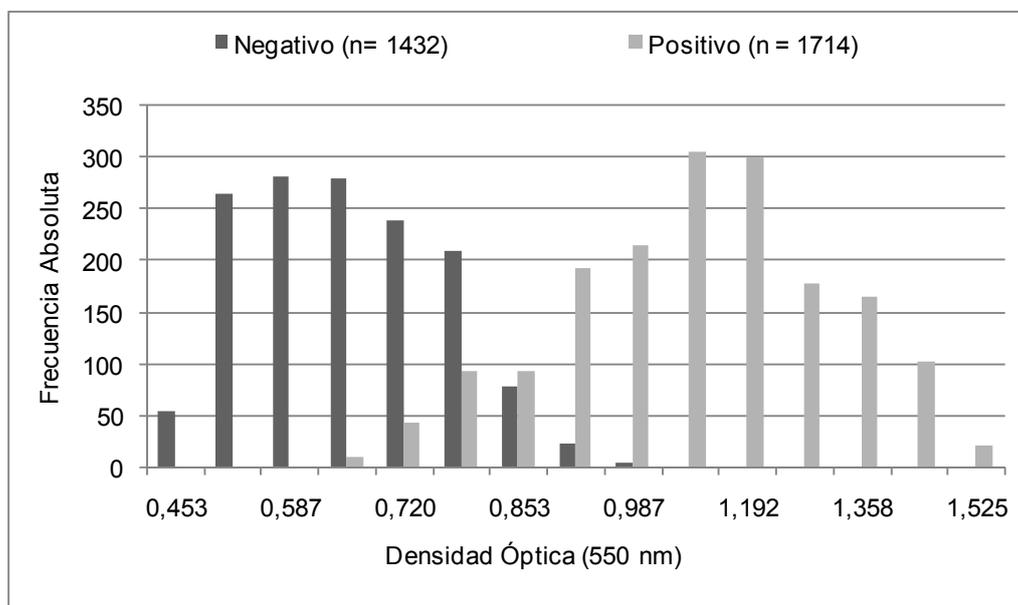


Figura V.1. Frecuencias absolutas en función de las densidades ópticas para las calificaciones positivas y negativas del Bioensayo BT.

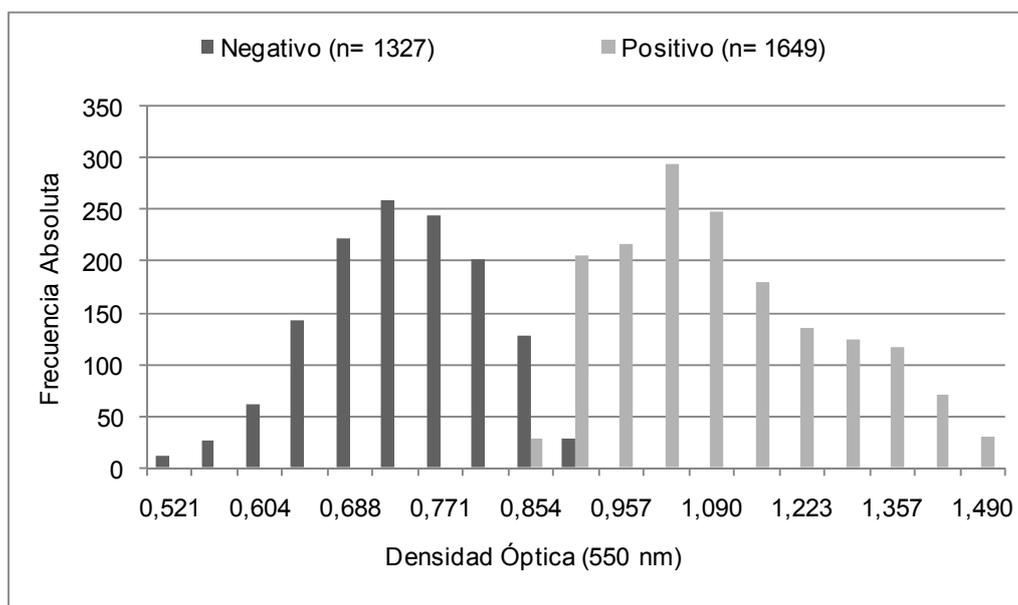


Figura V.2. Frecuencias absolutas en función de las densidades ópticas para las calificaciones positivas y negativas del Bioensayo BS.

Para el bioensayo BT, se presenta una superposición en las frecuencias de las interpretaciones positivas y negativas dentro del rango comprendido entre 0,7 y 1,0 unidades de densidades ópticas, mientras que Bioensayo BS muestra una región de superposición de los resultados de las muestras “positivas” y “negativas” en el rango de densidades ópticas comprendidas entre 0,80 y 0,95 unidades.

V.1.2. Efecto de las densidades ópticas sobre las especificidades y sensibilidades de los Bioensayos BT y BS

Las Figura V.3 (ResScreen® BT) y Figura V.4 (ResScreen® BS) presentan el efecto de la densidad óptica sobre los parámetros de especificidad (muestras negativas) y sensibilidad (muestras positivas) de ambos bioensayos. También se representó la media aritmética de las suma de estos parámetros.

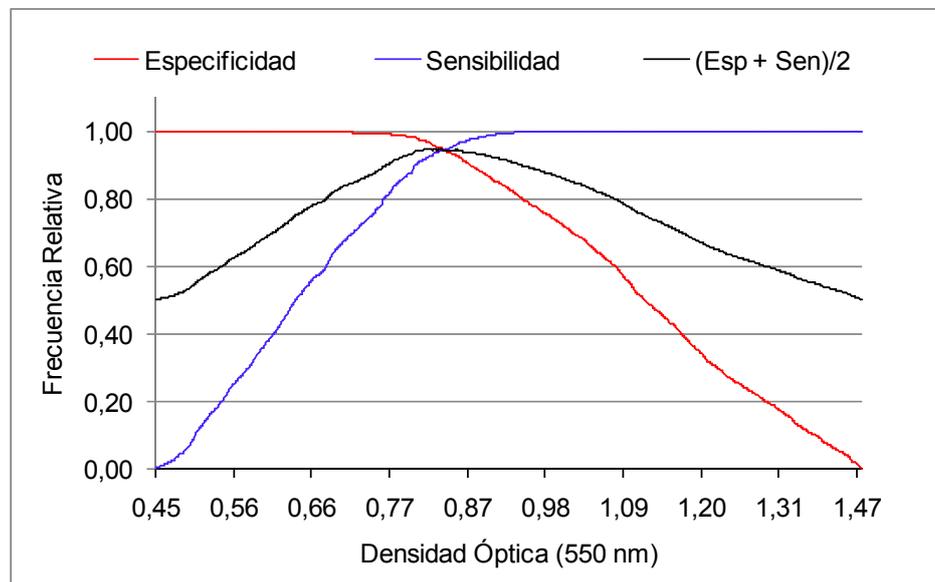


Figura V.3. Efecto de la densidad óptica sobre la especificidad, sensibilidad y media aritmética de ambas propiedades para el Bioensayo BT.

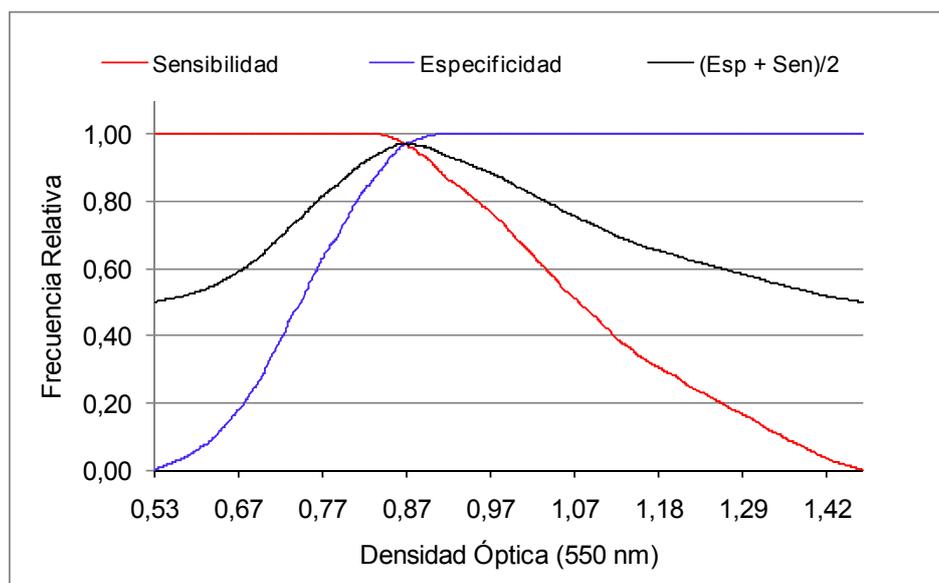


Figura V.4. Efecto de la densidad óptica sobre la especificidad, sensibilidad y media aritmética de ambas propiedades para el Bioensayo BS.

A bajos valores de densidades ópticas (inferiores a 0,77), la especificidad del Bioensayo BT es muy buena, mientras que la sensibilidad es óptima para densidades superiores a 1,00. Además, la curva correspondiente a la semisuma de estas dos propiedades $(Esp + Sen)/2$ alcanza sus máximos valores en la región comprendida entre 0,77 y 0,98 unidades de absorbancias. Dentro de este rango debe ubicarse el *cut off*, puesto que en esta región son máximos los parámetros de especificidad y sensibilidad. Para Bioensayo BS (Figura V.4), la región donde es máxima la sensibilidad y la especificidad está ubicada entre las densidades ópticas 0,77 y 0,97.

V.1.3. Análisis de las curvas ROC para los Bioensayos BT y BS

Con el propósito de establecer el valor de corte para lograr la máxima diferenciación entre los resultados negativos (especificidad) y positivos (sensibilidad) se construyeron las curvas ROC (Receiver Operating Characteric) para Bioensayo BT (Figura V.5) y Bioensayo BS (Figura V.6). La forma de ambas curvas muestra el

adecuado poder de discriminación para las calificaciones visuales positivas y negativas. Las áreas bajo las curvas ROC fueron elevados para el método BT (0,991) y BS (0,997), poniendo de manifiesto el adecuado grado de discriminación alcanzado al utilizar las densidades ópticas a 550 nm.

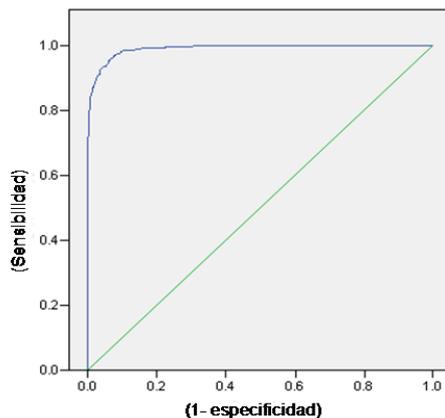


Figura V.5. Curva ROC para el Bioensayo BT

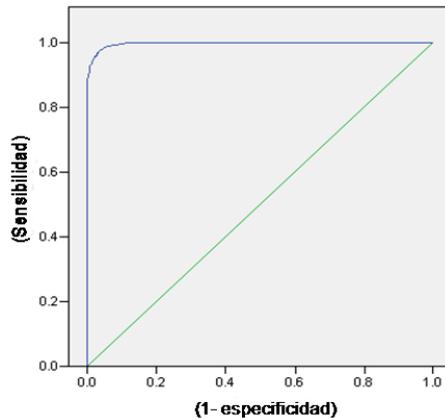


Figura V.6. Curva ROC para el Bioensayo BS

La Tabla V.2 resume los parámetros de especificidad y sensibilidad para diferentes valores de densidad óptica. En el caso del método BT, el *cut off* mejora cuando se elige una DO de 0,84 (0,944 de especificidad y 0,942 de sensibilidad) en comparación con una DO de 0,80 que presenta mejor especificidad (0,981) pero sensibilidad mas pobre (0,900)

o una DO de 0,88 que muestra peor especificidad (0,893) y un mejor valor de sensibilidad (0,978).

Tabla V.2. Valores de especificidad y sensibilidad para diferentes valores de *cut off* para el sistema ResScreen®

Bioensayo	<i>Cut Off</i>	Especificidad	Sensibilidad
ResScreen® BT	0,80	0,981	0,900
	0,84	0,944	0,942
	0,88	0,893	0,978
ResScreen® BS	0,82	1,000	0,845
	0,86	0,971	0,968
	0,90	0,908	0,995

En forma similar, el método BS muestra los mejores parámetros de especificidad (0,971) y sensibilidad (0,968) para un *cut off* de 0,86 unidades de densidades ópticas en comparación con el corte a 0,82 que presenta una especificidad del 100% y menor sensibilidad (0,845), o el corte a 0,90 unidades de absorbancia que mejora la sensibilidad (0,995) pero empeora la especificidad (0,908).

V.1.4. Cálculo de las densidades ópticas relativas de corte para cada antibiótico mediante los bioensayos BT y BS

Haciendo uso de las densidades ópticas absolutas de las muestras negativas y positivas de cada antimicrobiano, los valores de *cut off* resaltados en la Tabla V.2 y la Ecuación IV.3, se calcularon los valores de densidades ópticas relativas de corte para los bioensayos BT y BS. Por ello, en la Tabla V.3. se exponen los valores de densidades ópticas absolutas y las densidades ópticas relativas porcentuales de corte para los Bioensayos BT y BS.

Se puede observar que los valores promedios para establecer el punto de corte son 48 % y 49 % para los métodos BT y BS, respectivamente. Estos valores resultan similares al criterio del 45% utilizados por Luitz (1995a,b), Luitz *et al.* (1995), Schliephake

(1995), Suhren (1995) y Althaus *et al.* (2003), motivo por el cual los cálculos de las capacidades de detección se efectuarán con dicho criterio.

Tabla V.3. Densidades ópticas relativas de corte para los Bioensayos BT y BS

Antibiótico	Bioensayo BT			Bioensayo BS		
	D O mínima	D O máxima	DO Corte	D O mínima	D O máxima	DO Corte
<i>Betalactámicos</i>						
Penicilina G	0,607	1,252	36,1	0,687	1,051	47,5
Amoxicilina	0,521	1,254	43,5	0,735	0,933	63,1
Ampicilina	0,432	1,309	46,5	0,621	1,147	45,4
Cloxacilina	0,576	1,175	44,1	0,667	1,103	44,3
Oxacilina	0,581	1,171	43,9	0,699	1,056	45,1
Cefadroxil	0,531	1,112	53,2	0,714	1,023	47,2
Cefalexina	0,525	1,103	54,5	0,662	1,153	40,6
Cefoperazone	0,626	1,152	40,7	0,622	1,161	44,2
Cefuroxime	0,525	1,119	53,0	0,591	1,059	57,5
Ceftiofur®	0,594	1,168	42,9	0,652	1,012	59,8
<i>Aminoglucosidos</i>						
Gentamicina	0,604	1,258	36,1	0,635	1,09	49,5
Kanamicina	0,583	1,256	38,2	0,696	0,935	68,6
Neomicina	0,583	1,087	51,0	0,625	1,074	52,3
Estreptomina	0,617	1,21	37,6	0,775	0,963	45,2
<i>Macrolidos</i>						
Eritromicina	0,620	1,283	33,2	0,711	1,113	37,1
Espiramicina	0,679	1,151	34,1	0,64	1,092	48,7
Lincosamina	0,538	1,33	38,1	0,603	1,08	53,9
Tilosina	0,623	1,295	32,3	0,695	1,052	46,2
<i>Quinolonas</i>						
Ciprofloxacina	0,581	1,123	47,8	0,697	1,035	48,2
Enrofloxacin	0,517	0,896	85,2	0,657	0,911	79,9
Marbofloxacina	0,571	1,156	46,0	0,642	1,092	48,4
Norfloxacina	0,518	1,048	60,8	0,704	1,079	41,6
<i>Sulfamidas</i>						
Sulfatiazol	0,516	0,936	77,1	0,656	1,145	41,7
Sulfametoxazol	0,553	0,981	67,1	0,64	1,115	46,3
Sulfadimetoxina	0,502	1,066	60,1	0,629	1,115	47,5
Sulfametazina	0,561	0,953	71,2	0,674	1,134	40,4
Sulfadiazina	0,556	1,045	58,1	0,545	1,171	50,3
<i>Tetraciclinas</i>						
Clortetraciclina	0,655	1,1434	37,9	0,612	1,176	44,0
Oxitetraciclina	0,583	1,168	43,9	0,669	1,129	41,5
Tetraciclina	0,649	1,1916	35,2	0,674	1,116	42,1
<i>Cut Off promedio (porcentual)</i>			48 %			49 %

V.2. Estudios de Capacidades de Detección del sistema microbiológico ResScreen®

V.2.1. Capacidad de detección del Bioensayo BT

V.2.1.1. Capacidades de detección de antibióticos betalactámicos con Bioensayo

BT: La aplicación del modelo de regresión logística a las curvas dosis respuesta de los 10 antibióticos betalactámicos determinadas mediante las absorbancias relativas porcentuales para el bioensayo BT, se muestra en la Tabla V.4.

Tabla V.4. Coeficientes del modelo de regresión logística para las curvas dosis respuestas de las absorbancias relativas porcentuales del Bioensayo BT utilizado con penicilinas en leche

Betalactámicos	Logit [P] = $\beta_0 + \beta_1$ [Betalactámico]	C
Penicilinas		
Amoxicilina	Logit [P] = -6,8792 + 0,8992 [AMO]	92,6
Ampicilina	Logit [P] = -4,7931 + 0,6691 [AMP]	89,9
Cloxacilina	Logit [P]= -7,8820 + 0,2045 [CLOXA]	94,5
Oxacilina	Logit [P]= -6,4137 + 0,3765 [OXA]	90,4
Penicillina "G"	Logit [P]= -3,5494 + 1,0125 [PEN]	85,5
Cefalosporinas		
Cefadroxil	Logit [P]= -3,5502 + 0,0347 [CXL]	84,8
Cefalexina	Logit [P]= -5,1230 + 0,0600 [CLX]	94,0
Cefoperazone	Logit [P]= -3,5178 + 0,0518 [CPZ]	89,6
Ceftiofur®	Logit [P]= -2,7680 + 0,0449 [CFR]	81,6
Cefuroxime	Logit [P]= -4,2925 + 0,0435 [CFR]	92,6

AMO: amoxicilina, AMP: ampicilina, CLOXA: cloxacilina, OXA: oxacilina, PEN: penicilina, CXL: cefadroxil, CLX: cefalexina, CPZ: cefoperazone, CFR: ceftiofur, CFR: cefuroxime, C: concordancia porcentual.

Se aprecia que los ajustes logrados mediante el modelo logístico fueron buenos, ya que los coeficientes de concordancia se encuentran comprendidos entre 81,6% para Ceftiofur® y 94,5% para la cloxacilina. En todos los casos, los términos correspondientes al parámetro " β_1 " fueron más elevados para las penicilinas que las cefalosporinas,

poniendo de manifiesto una mayor sensibilidad de *Geobacillus stearothermophilus* para detectar betalactámicos, ya que pequeños incrementos en sus concentraciones producen un marcado efecto sobre la absorbancia relativa porcentual. Además, dentro de las penicilinas, se observa que penicilina "G" presenta mayor valor del coeficiente " β_1 ", seguido de ampicilina, amoxicilina, oxacilina y cloxacilina, mientras que para las cefalosporinas, cefuroxime y cefoperazone poseen mayor valor de " β_1 " que las demás.

Con el propósito de visualizar las curvas dosis-respuesta de los antibióticos betalactámicos en leche cuando se emplea el bioensayo BT, se construyeron las Figura V.7 y Figura V.8, donde se muestra el efecto de las concentraciones de penicilinas y cefalosporinas sobre las absorbancias relativas porcentuales.

Según la Figura V.7, pequeños incrementos en las concentraciones de penicilina, ampicilina y amoxicilina permiten alcanzar el 100% de la absorbancia relativa (mayores valores de los coeficientes " β_1 "), mientras que la cloxacilina muestra una curva dosis-respuesta más suave que las anteriores. Un comportamiento similar fue observado por Nagel (2009) cuando efectúa lecturas visuales del Bioensayo BT.

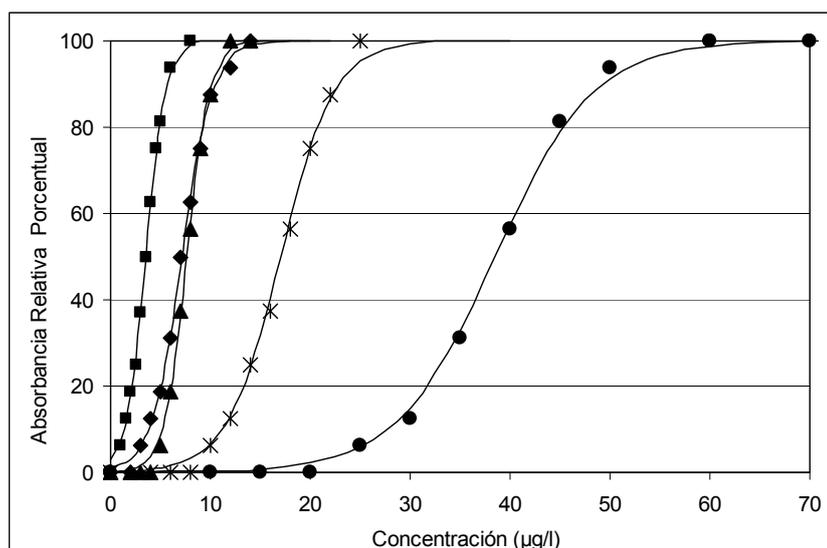


Figura V.7. Curvas dosis respuestas de penicilinas en leche analizadas por el Bioensayo BT. (■: penicilina, ▲: amoxicilina, ◆: ampicilina, ●: cloxacilina, x: oxacilina).

Por el contrario, las curvas dosis-respuesta de las cefalosporinas presentan un comportamiento similar, ya que se encuentran prácticamente superpuestas. Nagel (2009) obtiene mayores valores de los coeficientes " β_1 " cuando realiza interpretaciones visuales del bioensayo BT, destacando que cefadroxil presenta un menor crecimiento en su curva dosis-respuesta que las demás cefalosporinas.

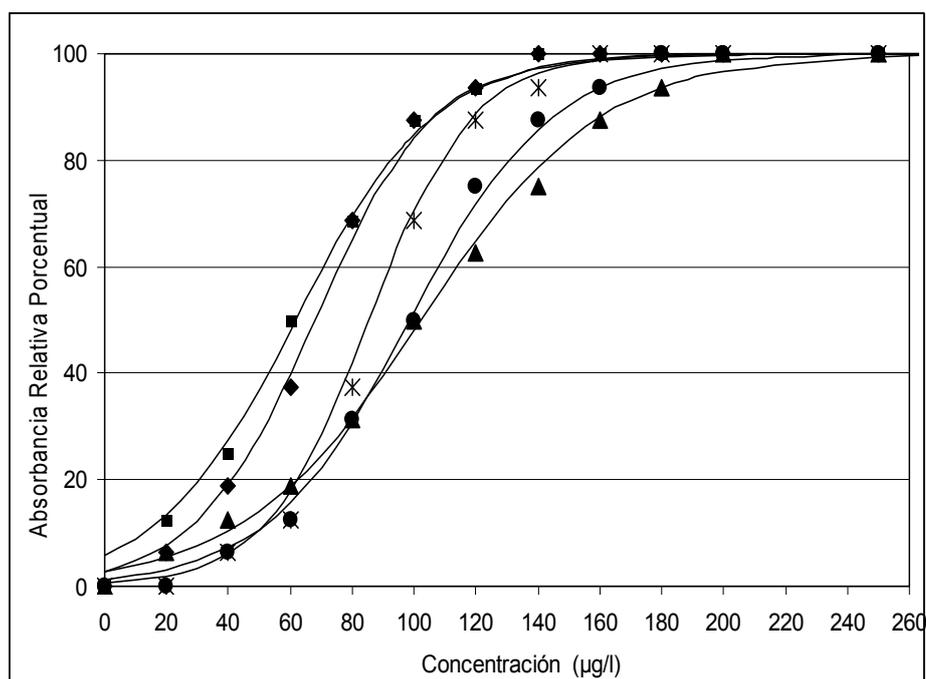


Figura V.8. Curvas dosis respuestas de cefalosporinas de leche analizadas por el Bioensayo BT. (▲: cefadroxil, x: cefalexina, ◆: cefoperazone, ●: cefuroxime, ■: ceftiofur®).

Las capacidades de detección para los 10 antibióticos betalactámicos (Tabla V.5) se calcularon mediante las ecuaciones logísticas de la Tabla V.4y el criterio del 45% de la absorbancia relativa porcentual para calificaciones fotométricas (Luitz, 1995a,b; Schliephake, 1995; Suhren, 1995; Althaus *et al.*, 2002).

Cuando se comparan las CD α de cada antibiótico con sus correspondientes LMRs, resulta evidente que el método permite detectar residuos de penicilina, oxacilina, cloxacilina, cefalexina, ceftiofur® y cefoperazone en leche a niveles cercanos a sus

respectivos LMRs, mientras que la amoxicilina, ampicilina deben estar presentes en una concentración prácticamente el doble de sus LMRs para que el Bioensayo BT pueda detectarlo.

Tabla V.5. Capacidades de detección de antibióticos betalactámicos en leche mediante el Bioensayo BT

Betalactámico	CD $\alpha_{45\%}$	CD α_{visual}^*	LMR
Amoxicilina	7,4	9	4
Ampicilina	8	7	4
Cloxacilina	41	42	30
Oxacilina	19	17	30
Penicilina "G"	4	3	4
Cefadroxil	120	159	-
Cefalexina	96	99	100
Cefoperazone	80	62	50
Ceftiofur [®]	119	105	100
Cefuroxime	113	52	-

CD α : Capacidad de detección, LMR: Límite Máximo de Residuo, * Nagel (2009).

Para interpretaciones visuales del Bioensayo BT, Nagel (2009) obtiene capacidades de detección muy similares para amoxicilina (9 $\mu\text{g/l}$), ampicilina (7 $\mu\text{g/l}$), cloxacilina, (42 $\mu\text{g/l}$), oxacilina (17 $\mu\text{g/l}$) y penicilina (3 $\mu\text{g/l}$) en leche.

Las CD α calculadas para la amoxicilina mediante este Bioensayo son levemente superiores a los obtenidos por Charm y Ruth (1993) y Zorraquino (1997b, 1998) cuando utilizan el método BRT[®] AiM (5 $\mu\text{g/l}$), aunque Zaadhof *et al.* (1997) informaron una CD α para esta penicilina comprendida entre 20 y 30 $\mu\text{g/l}$, superior a la obtenida para el Bioensayo BT.

Para el método Delvotest[®] SP, Tramontin *et al.* (1992), Honkanen-Buzalski y Reybroech (1995) y Lacroix (1995) obtienen niveles de detección inferiores (4, 6 y 3 $\mu\text{g/l}$,

respectivamente) a los reportados para el Bioensayo BT, aunque otros autores señalan valores similares a la capacidad que presenta amoxicilina de la Tabla V.5. Así por ejemplo, Senyk *et al.* (1989), Charm y Ruth (1993), Gardner *et al.* (1996) y Sischo (1996) obtienen concentraciones de 11-18, 10, 8 y 8 µg/l, respectivamente.

En forma similar, la ampicilina presentó una CD α para Bioensayo BT levemente superior (7 y 8 µg/l) a los valores calculados por otros autores (Heeschen, 1993; Heeschen y Blüthgen, 1995; Zorraquino, 1997b, 1998) para el método BRT[®] AiM (5 µg/l), aunque Charm y Ruth (1993), calculan un valor de 10 µg/l, levemente superior a la señalada en la Tabla V.5.

Cuando muestras de leche que contienen residuos de ampicilina son analizadas por el método Delvotest[®] SP, Luitz *et al.* (1995) y Lacroix (1995) señalan niveles más bajos (3 y 4 µg/l, respectivamente), sin embargo otros autores (Smink, 1979; Senyk *et al.*, 1990; Van Os y Beukers, 1980; Charm y Ruth, 1993; Honkanen-Buzalski y Reybroech, 1995; Gardner *et al.*, 1996; Sischo, 1996) obtienen para el método Delvotest[®] SP, CD α más elevadas (6-10 µg/l), próximos a las calculadas para el Bioensayo BT.

Cloxacilina, por su parte, mostró una CD α para Bioensayo BT similar al LMR y a los niveles (40-50 µg/l) publicados por diferentes autores (Jaskch, 1988; Heeschen, 1993; Heeschen y Blüthgen, 1995; Zorraquino, 1997a y Analytic in Milch, 1998), aunque Charm y Ruth (1993) calcularon un valor superior (100 µg/l) para el método BRT[®] AIM.

Cuando se emplea el método microbiológico Delvotest[®] SP, cloxacilina es detectada en un rango de 20-30 µg/l (Van Os y Beukers, 1980; Honkanen-Buzalski y Reybroech, 1995; Lacroix, 1995; Gardner *et al.*, 1996; Luitz *et al.*, 1995). No obstante, otros estudios señalan CD α más cercanas a los valores obtenidos para el Bioensayo BT, tales como 35 µg/l (Smink, 1979), 50 µg/l (Charm y Ruth, 1993) y 41-81 µg/l (Senyk *et al.*, 1990).

La CD α de la penicilina (antibiótico más utilizado en el ganado bovino de leche) calculada para el bioensayo BT es similar al LMR, aunque diferentes autores obtienen niveles inferiores para el método BRT[®] AiM, tales como 1,5 $\mu\text{g/l}$ (Heeschen y Blüthgen, 1995) y a los rangos de 1-2 $\mu\text{g/l}$ (Frank, 1995), 2-3 $\mu\text{g/l}$ (Zaadhof *et al.*, 1997) y 2-3 $\mu\text{g/l}$ (Zorraquino, 1997b, 1998), por el contrario Jaskch (1988), Charm y Ruth (1993) y Heeschen (1993) indican valores de CD α de penicilina "G" superiores (6 a 10 $\mu\text{g/l}$).

Por otra parte, cuando se utiliza el método Delvotest[®] SP, la CD α de la penicilina en leche fue de 3 $\mu\text{g/l}$ y resulta similar (Tramontin *et al.*, 1992; Charm y Ruth, 1993; Honkanen-Buzalski y Reybroech, 1995; Lacroix, 1995; Gardner *et al.*, 1996; Sischo, 1996; Zaadhof *et al.*, 1997) a las 3 y 4 $\mu\text{g/l}$ determinadas para el Bioensayo BT, aunque Smink (1979) obtiene un valor superior (6 $\mu\text{g/l}$) para residuos de penicilina analizados por Delvotest[®] SP.

Para las penicilinas, los trabajos realizados en leche de oveja señalan capacidades similares para el método BRT[®] AiM (6 $\mu\text{g/l}$ de amoxicilina, 6 $\mu\text{g/l}$ de ampicilina, 51 $\mu\text{g/l}$ de cloxacilina) según Molina *et al.* (2003), el método Delvotest[®] SP (5 $\mu\text{g/l}$ de amoxicilina, 3 $\mu\text{g/l}$ de ampicilina y 23 $\mu\text{g/l}$ de cloxacilina) acorde a los estudios de Althaus *et al.* (2002) y el método Eclipse[®] 100ov (7 $\mu\text{g/l}$ de amoxicilina, 5 $\mu\text{g/l}$ de penicilina "G", 68 $\mu\text{g/l}$ de cloxacilina y 28 $\mu\text{g/l}$ de oxacilina) como lo señalan Montero *et al.* (2005).

Respecto a las cefalosporinas, Nagel (2009) cuando efectúa lecturas visuales del Bioensayo BT, señala CD α muy próximos a las establecidas en la Tabla V.5 para cefalexina (159 $\mu\text{g/l}$), cefadroxil (99 $\mu\text{g/l}$), cefoperazone (62 $\mu\text{g/l}$), ceftiofur[®] (105 $\mu\text{g/l}$) y cefuroxime (52 $\mu\text{g/l}$).

Para otros métodos de inhibición microbiológicos, Charm y Ruth (1993) obtienen cuando analizan muestras de leche fortificadas con ceftiofur[®] con el método BRT[®] AiM, capacidades de detección dentro del rango 105 - 119 $\mu\text{g/l}$, aunque Zorraquino (1997b, 1998) obtiene valores más elevados (150 a 200 $\mu\text{g/l}$) para este método. Al emplear el

método Delvotest[®] SP para detectar residuos de ceftiofur[®] en leche de vaca, Charm y Ruth (1993), Honkanen-Buzalski y Reybroech (1995), Lacroix (1995), Gardner *et al.*, (1996) y Sischo (1996) indican niveles más bajos (50 µg/l) al calculado para el Bioensayo BT.

La CD α del cefoperazone en leche (62-80 µg/l) para el Bioensayo BT resulta similar a las 80 µg/l señaladas por Jaskch (1988) para el método BRT[®] AiM, sin embargo, Zorraquino (1997b, 1998) obtiene un valor inferior (42 µg/l) para este método. Este autor informa para la cefalexina una CD α (270 µg/l) superior a la expuesta en la Tabla V.5 para el método BT (96 µg/l).

En lo que respecta a las CD α de cefadroxil y cefuroxime, se debe destacar que no se han encontrado valores de referencia en la bibliografía consultada.

También las capacidades de la Tabla V.5 resultaron similares a los niveles detectados por Molina *et al.* (2003) en leche de oveja cuando utiliza el método BRT[®] AiM (230 µg/l cefadroxil; 270 µg/l de cefalexina, 92 µg/l de cefoperazone, 120 µg/l de Ceftiofur[®] y 69 µg/l de cefuroxime) y a los calculados al emplear el método Delvotest[®] SP (63 µg/l de cefadroxil, 68 µg/l de cefalexina, 41 µg/l de cefoperazone, 59 µg/l de ceftiofur[®] y 41 µg/l de cefuroxime) por Althaus *et al.* (2002). Para el método Eclipse[®] 100 ov (86 µg/l de cefadroxil, 115 µg/l de cefalexina, 110 µg/l de cefoperazone y 85 µg/l de cefuroxime), Montero *et al.* (2005) determina CD α similares en leche de oveja.

V.2.1.2. Capacidades de detección de tetraciclinas con Bioensayo BT: En la Tabla V.6 se resumen las ecuaciones matemáticas obtenidas mediante la aplicación del modelo de regresión logística para analizar el efecto de las concentraciones de tetraciclinas en leche sobre las absorbancias relativas porcentuales del Bioensayo BT.

Tabla V.6. Coeficientes del modelo de regresión logística para las curvas dosis respuestas de las absorbancias relativas porcentuales del Bioensayo BT utilizado con tetraciclinas en leche

Tetraciclina	Logit [P] = $\beta_0 + \beta_1$ [TCs]	C
Clortetraciclina	Logit [P] = - 2,9333 + 0,00874 [CTC]	80,9
Oxitetraciclina	Logit [P]= - 4,0001 + 0,0262 [OTC]	89,3
Tetraciclina	Logit [P]= - 4,4139 + 0,0275 [TC]	89,9

TCs: tetraciclinas, CTC: clortetraciclina, OTC: oxitetraciclina, TC: tetraciclina, C: concordancia porcentual.

Los mayores valores de los coeficientes " β_1 " para la oxitetraciclina y tetraciclina ponen de manifiesto la mayor sensibilidad de *G. stearotherophilus* para su detección, en comparación con la clortetraciclina que posee menor valor de este parámetro. Con respecto al ajuste alcanzado con el modelo logístico, se puede observar en Tabla V.6 que ha sido bueno con elevados coeficientes de concordancia porcentual.

Las curvas dosis-respuesta de las muestras de leche fortificadas con tetraciclinas para el Bioensayo BT se visualizan en la Figura V.9, se observa un mayor incremento en las absorbancias relativas porcentuales para oxitetraciclina y tetraciclina con respecto a la clortetraciclina, debido a los diferentes valores del término " β_1 ".

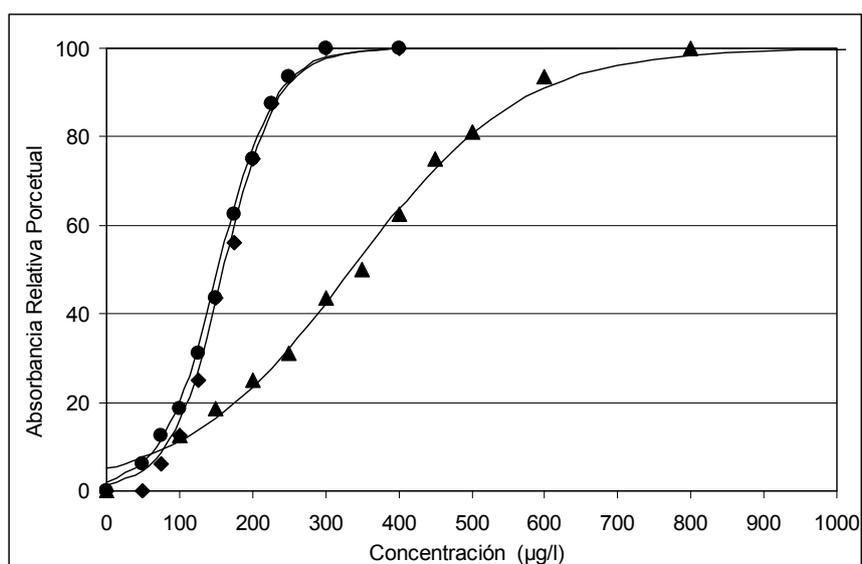


Figura V.9. Curvas dosis respuestas de tetraciclinas en leche analizadas por el Bioensayo BT. (▲: clortetraciclina, ●: oxitetraciclina, ◆: tetraciclina).

Las CD α del Bioensayo BT calculadas mediante el criterio del 45% de las tres tetraciclinas se resumen en Tabla V.7. Oxitetraciclina y tetraciclina presentaron menores niveles de detección, pero son más elevados que sus correspondientes LMRs.

Para lecturas visuales del Bioensayo BT, Nagel (2009) obtiene CD α más bajas que los reportadas en la Tabla V.7 para clortetraciclina (275 $\mu\text{g/l}$), oxitetraciclina (150 $\mu\text{g/l}$) y tetraciclina (158 $\mu\text{g/l}$), debido probablemente a la diferencia entre los criterios de cálculo de las CD α , según se trabaja con lecturas visuales (95% de la frecuencia de resultados positivos) o absorbancias relativas porcentuales (45% de la absorbancia relativa).

Tabla V.7. Capacidades de detección de antibióticos tetraciclinas en leche mediante el Bioensayo BT

Tetraciclina	CD $\alpha_{45\%}$	CD α_{Visual}^*	LMR
Clortetraciclina	400	275	100
Oxitetraciclina	180	150	100
Tetraciclina	180	158	100

CD α : Capacidad de detección, LMR: Límite Máximo de Residuo, *: Nagel (2009).

Cuando se consideran otros test de inhibición microbiológica que utilizan *G. stearothermophilus*, se observa que Delvotest[®] "SP" presenta capacidades de detección para OTC de 400 $\mu\text{g/l}$ (Zaadhof *et al.*, 1997) o de 500 $\mu\text{g/l}$ (Luitz y Suhren, 1996) y de 600 $\mu\text{g/l}$ (Senyk *et al.*, 1990) para TC en leche, que resultan superiores a los obtenidos en este trabajo.

El método BRT[®] AiM presenta altos valores de CD α . Así, Frank (1995) obtiene valores cercanos a 5000 $\mu\text{g/l}$ cuando analiza residuos de OTC y de TC en leche de la vaca. Se debe destacar, las CD α de la TCs son elevadas puesto que este bioensayo

utiliza Müeller Hinton como medio de cultivo y un indicador redox (Negro Brillante) sin la adición de sustancias secuestrantes de calcio.

En forma similar, el método Eclipse® "100ov" puede detectar 500 µg/l de CTC y 460 µg/l de TC en leche de oveja (Montero *et al.*, 2005), valores superiores a los alcanzados en este trabajo mediante la incorporación de CAP.

En leche de otras especies, el método Delvotest® SP que contiene agentes quelantes en el medio de cultivo posee CDα más elevadas a las calculadas en este trabajo (Tabla V.7), ya que detecta 180 µg/l de DC, 320 µg/l de OTC y 590 µg/l de TC (Althaus *et al.*, 2002).

V.2.1.3. Capacidades de detección de sulfamidas con Bioensayo BT: Las expresiones matemáticas que representan las curvas dosis-respuesta para las calificaciones fotométricas del Bioensayo BT utilizado con muestras de leche fortificadas con sulfamidas se exponen en la Tabla V.8. Se aprecia que los ajustes alcanzados mediante la implementación del modelo regresión logística fueron buenos, al estar comprendidos entre 89,1% (SMZ y STZ) y el 93,2% (SMZ).

Tabla V.8. Coeficientes del modelo de regresión logística para las curvas dosis respuestas de las absorbancias relativas porcentuales del Bioensayo BT utilizado con sulfamidas en leche

Sulfamidas	Logit [P] = $\beta_0 + \beta_1$ [SAs]	C
Sulfadiazina	Logit [P] = -2,6766+0,00008 [SDA]	93,2
Sulfadimetoxina	Logit [P] = -7,2120+0,0008 [SDM]	92,6
Sulfametazina	Logit [P]= -1,6760 +0,00007 [SMT]	89,1
Sulfametoxazol	Logit [P]= -4,7884+0,00055 [SMX]	91,0
Sulfatiazol	Logit [P]= -5,7720+0,0006 [STZ]	89,1

SAs: sulfamidas, SDZ: sulfadiazina, SDM: sulfadimetoxina, SMZ: sulfametazina, SMX: sulfametoxazol, STZ: sulfatiazol, C: concordancia porcentual.

Los coeficientes " β_1 " calculados mediante el modelo logístico fueron más bajos en las sulfamidas (Tabla V.8) que los obtenidos para los antibióticos betalactámicos con el mismo método (Tabla V.4), debido a la baja sensibilidad que presenta *G. stearothermophilus* para detectar residuos de SAs en leche.

Haciendo uso de las ecuaciones de la Tabla V.8 se construyó la Figura V.10, donde se visualiza el efecto de las concentraciones de SAs sobre las absorbancias relativas porcentuales del Bioensayo BT.

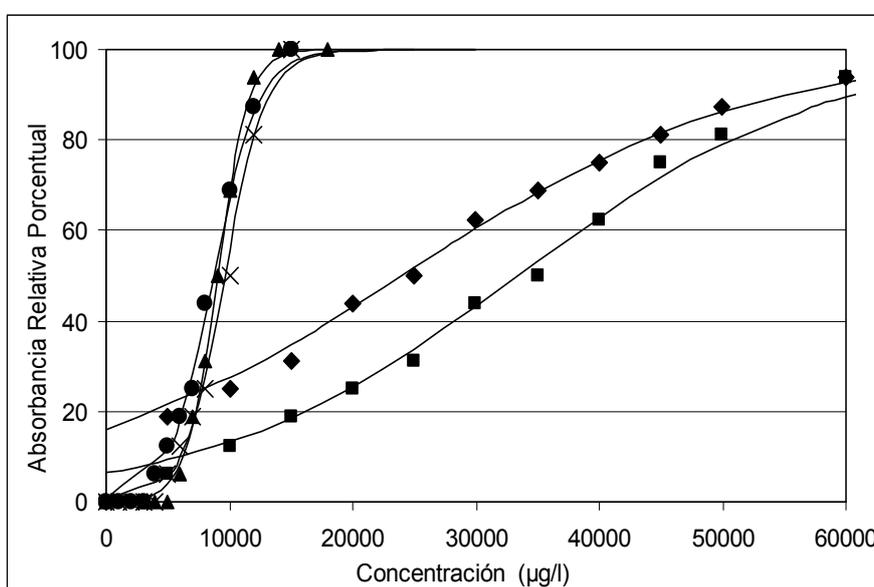


Figura V.10. Curvas dosis respuestas de sulfamidas en leche analizadas por el Bioensayo BT. (■: sulfadiazina, ▲: sulfadimetoxina, ●: sulfametoxazol, x: sulfatiazol, ◆: sulfametazina).

Se aprecia que SDM, SMX y STZ presentan una curva dosis-respuesta con mayores pendientes de crecimiento que SDA y SMT, debido a los mayores valores de los coeficientes " β_1 " (Tabla V.8).

En la Tabla V.9 se resumen las CD_{α} calculadas mediante el criterio del 45% de las absorbancias relativas porcentuales (lecturas fotométricas) para residuos de SAs en leche analizadas con Bioensayo BT.

Tabla V.9. Capacidades de detección de sulfamidas en leche mediante el Bioensayo BT

Sulfamidas	CD $\alpha_{45\%}$	CD α_{Visual}^*	LMR
Sulfadiazina	41000	49000	100
Sulfadimetoxina	9800	12000	100
Sulfametazina	33000	30000	100
Sulfametoxazol	9900	14000	100
Sulfatiazol	11000	13000	100

CD: Capacidad de detección, LMR: Límite Máximo de Residuo, *: Nagel (2009).

Las CD α de las cinco SAs son más elevadas (Tabla V.9) que el LMR (100 $\mu\text{g/l}$) establecido por la UE para estos antimicrobianos. Aunque se debe destacar que esta discrepancia del Bioensayo BT es una virtud, ya que este método es específico para la identificación de residuos de betalactámicos y tetraciclinas, no así para las sulfamidas que serán detectadas por el Bioensayo BS.

Para otros bioensayos, Heesch (1993) y Heesch y Blüthgen (1995) obtienen un rango de 100-1000 $\mu\text{g/l}$ y Charm y Ruth (1993) indican un nivel de detección de 1000 $\mu\text{g/l}$ para residuos de SDZ cuando emplean el método BRT[®] AiM, aunque no aclaran si el bioensayo está fortificado con pirimetaminas, como trimetoprim (Bioensayo BS).

Sin embargo, resulta conveniente mencionar que otros autores han determinado CD α elevadas para otras SAs cuando emplean el método BRT[®] AiM sin la implementación de antifolatos en el medio de cultivo. Así, Frank (1995) señala rangos de 5000-10000 $\mu\text{g/l}$ para STZ y 15000-50000 $\mu\text{g/l}$ para SMZ, mientras que Zorraquino (1997b) establece para esta sulfamida en leche de vaca un rango de 4800-5100 $\mu\text{g/l}$, todos ellos similares al observado para el Bioensayo BT sin la fortificación con TMP en el medio del cultivo.

En leche de oveja, cuando se utiliza el método BRT[®] AiM sin fortificar con pirimetamina, Molina *et al.* (2003) calculan CD_α elevadas para SDZ (5400 µg/l), SMX (3200 µg/l), sulfametoxipiridazina (6500 µg/l) y sulfaquinoxalina (6200 µg/l).

V.2.1.4. Capacidades de detección de otros antimicrobianos con Bioensayo BT: Con el propósito de analizar la respuesta del Bioensayo BT para otros agentes antimicrobianos diferentes a los betalactámicos, tetraciclinas y sulfamidas, se llevaron a cabo los estudios de especificidad cruzada con muestras de leche fortificadas con aminoglucósidos, macrólidos y quinolonas.

La Tabla V.10 muestra las ecuaciones logísticas calculadas para las absorbancias relativas porcentuales de diferentes agentes antimicrobianos analizados con el Bioensayo BT. Se puede observar que gentamicina, neomicina, eritromicina, lincomisina y tilosina presentaron mayores valores de los coeficientes " β_1 " que el resto de los antibióticos estudiados. Este hecho demuestra una mayor sensibilidad de *G. stearothermophilus* para estas moléculas, poniendo de manifiesto una posible especificidad cruzada del Bioensayo BT.

Los ajustes obtenidos mediante el modelo logístico fueron adecuados, puesto que los coeficientes de concordancia se hallan comprendidos en el rango 78,3% (tilosina) y 90,3% (espiramicina). Para visualizar los efectos que producen el incremento de las concentraciones de los antimicrobianos sobre las absorbancias relativas del Bioensayo BT se construyeron las Figura V.11 (aminoglucósidos), Figura V.12 (macrólidos) y Figura V.13 (quinolonas).

De los cuatro aminoglucósidos estudiados, gentamicina y neomicina presentan curvas dosis-respuestas con pendientes más pronunciadas que las curvas de kanamicina y estreptomina (por poseer mayores valores de los términos " β_1 "). Con respecto a los macrólidos, espiramicina mostró un menor valor del coeficiente " β_1 ", motivo por el cual,

sus curvas dosis-respuestas se muestran por separado. Las curvas logísticas de tilosina y lincomicina crecen más rápido ante bajos incrementos en sus concentraciones, en comparación con los otros macrólidos (Figura V.12).

Tabla V.10. Coeficientes del modelo de regresión logística para las curvas dosis respuestas de las absorbancias relativas porcentuales del Bioensayo BT utilizado con otros agentes antimicrobianos en leche

Antimicrobianos	Logit [P] = $\beta_0 + \beta_1$ [Antimicrobianos]	C
<i>Aminoglucósidos</i>		
Gentamicina	Logit [P] = -1,6709+0,0036 [GEN]	80,2
Kanamicina	Logit [P] = -5,3909+0,0011 [KAN]	86,0
Neomicina	Logit [P]= -2,0165+0,0022 [NEO]	81,3
Estreptomicina	Logit [P]= -4,2253+0,0019 [STM]	81,9
<i>Macrólidos</i>		
Eritromicina	Logit [P]= -3,5869+0,0122 [ERI]	89,8
Lincomicina	Logit [P]= -1,6333+0,0064 [LIN]	86,6
Espiramicina	Logit [P]= -4,5630+0,0013 [SPI]	90,3
Tilosina	Logit [P]= -1,5683+0,0214 [TIL]	78,3
<i>Quinolonas</i>		
Ciprofloxacina	Logit [P]= -3,5896+0,00147 [CIPRO]	88,6
Enrofloxacina	Logit [P]= -6,1819+0,0034 [ENRO]	89,2
Marbofloxacina	Logit [P]= -4,4572+0,00131 [MAR]	89,3
Norfloxacina	Logit [P]= -4,0561+0,00079 [NOR]	82,6

GEN: gentamicina, KAN: kanamicina, NEO: neomicina, STM: estreptomicina, ERI: eritromicina, LIN: lincomisina, SPI: espiramicina, TIL: tilosina, CIPRO: Ciprofloxacina, ENRO: enrofloxacina, MAR: marbofloxacina, NOR: norfloxacina, concordancia porcentual.

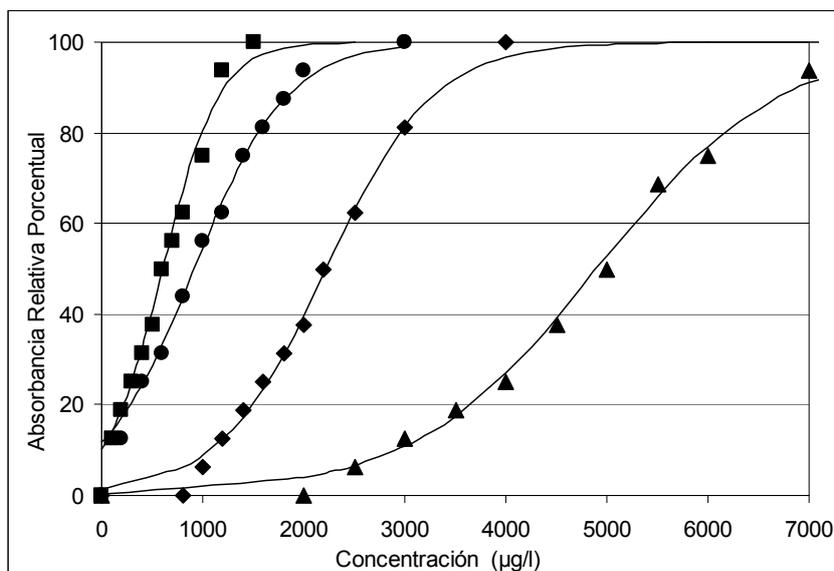


Figura V.11. Curvas dosis respuestas de aminoglucósidos en leche analizadas por el Bioensayo BT (■: gentamicina, ▲: kanamicina, •: neomicina, ●: estreptomicina).

Para el caso de las quinolonas (Figura V.13), enrofloxacin y ciprofloxacina mostraron mayor valor en su coeficiente “ β_1 ”, en comparación con marbofloxacina y norfloxacina. Se puede observar en dichas figuras que enrofloxacin posee mayor pendiente de ascenso en su curva dosis-respuesta. No obstante, las quinolonas poseen baja actividad antimicrobiana contra *G. stearothermophilus*, cuando se compara con otras moléculas como las penicilinas y cefalosporinas.

Las CD_{45} detección calculadas mediante el criterio del 45% de las lecturas fotométricas del Bioensayo BT a partir de las ecuaciones de la Tabla V.10, así como los LMRs de los aminoglucósidos, macrólidos y quinolonas se resumen en la Tabla V.11.

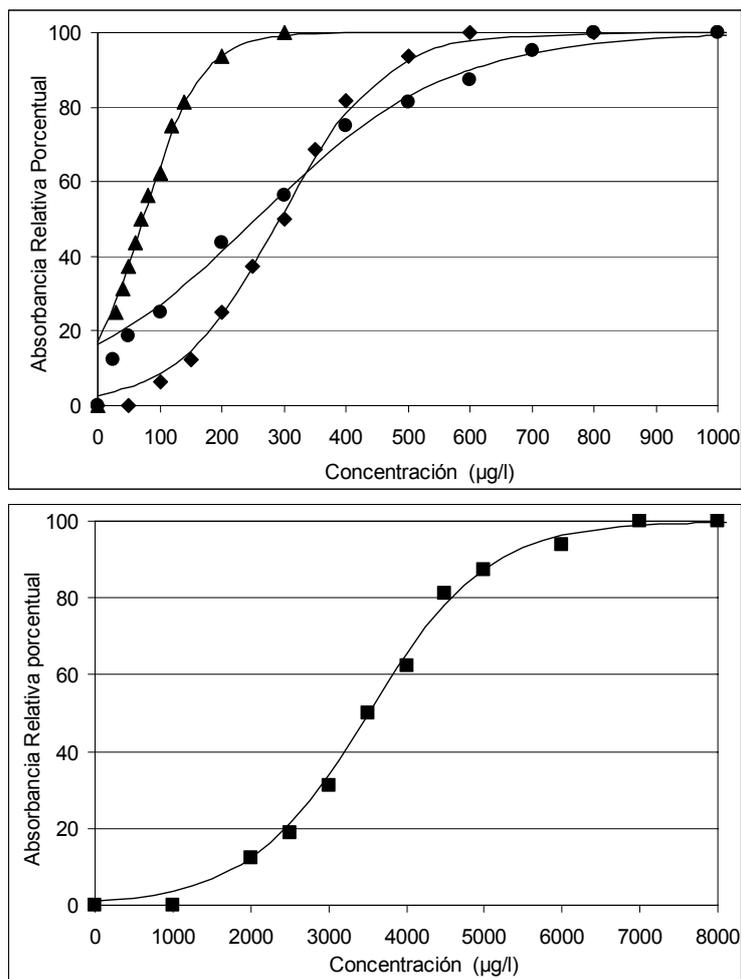


Figura V.12. Curvas dosis respuestas de macrólidos en leche analizadas por el Bioensayo BT. (▲: tilosina, ◆: eritromicina, ●: lincomicina, ■: espiramicina).

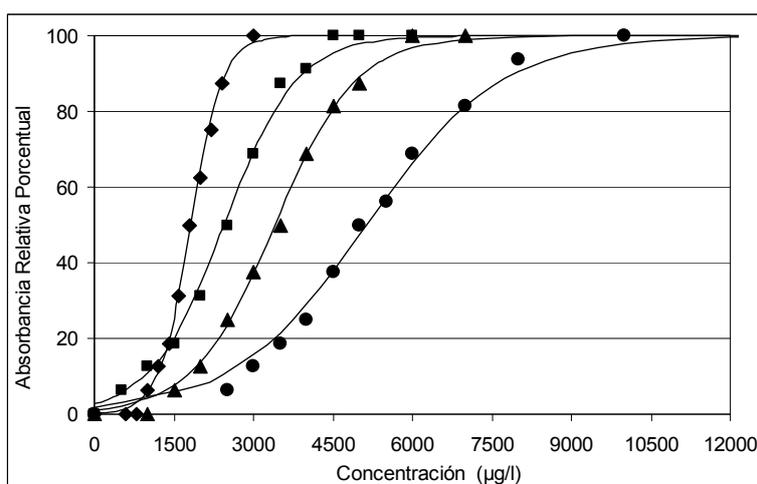


Figura V.13. Curvas dosis respuestas de quinolonas en leche analizadas por el Bioensayo BT (◆: enrofloxacin, ■: ciprofloxacin, ▲: marbofloxacin, ●: norfloxacin).

Tabla V.11. Capacidades de detección de otros antimicrobianos en leche mediante el bioensayo BT

Antimicrobianos	CD $\alpha_{45\%}$	CD α_{Visual}^*	LMR
<i>Aminoglucósidos</i>			
Gentamicina	640	320	100
Kanamicina	5500	5600	150
Neomicina	1200	600	1500
Estreptomina	2600	2300	200
<i>Macrólidos</i>			
Eritromicina	350	210	40
Lincomicina	350	150	150
Espiromicina	4000	3400	200
Tilosina	100	74	50
<i>Quinolonas</i>			
Ciprofloxacina	2000	1760	100
Enrofloxacin	2863	2020	100
Marbofloxacina	3900	2700	75
Norfloxacina	5900	7100	-

CD α : Capacidad de detección, LMR: Límite Máximo de Residuo, *: Nagel (2009).

- *Aminoglucósidos*: Para lecturas visuales del Bioensayo BT, Nagel (2009) calcula mediante el modelo logístico, CD α similares a las expuestas en la Tabla V.11 para gentamicina (320 $\mu\text{g/l}$), kanamicina (5600 $\mu\text{g/l}$), neomicina (600 $\mu\text{g/l}$) y estreptomina (2300 $\mu\text{g/l}$). Para otros métodos microbiológicos, gentamicina presenta CD α inferiores (320 y 640 $\mu\text{g/l}$) al rango 400-1000 $\mu\text{g/l}$ señalados por Frank (1995) para el método BRT[®] AiM.

Las CD α de neomicina (1200 $\mu\text{g/l}$) se encuentran dentro del rango de 300 a 5000 $\mu\text{g/l}$ establecida por el fabricante (Analytic in Milch, 1998), pero resultan superiores a las 500 $\mu\text{g/l}$ determinada por Charm y Ruth (1993). Aunque hay que destacar que Heeschen (1993) señala niveles más elevados para este aminoglucósido (22000 y 15000 $\mu\text{g/l}$) cuando emplea el método BRT[®] AiM.

Estreptomicina mostró para el Bioensayo BT, una CD α (2600 $\mu\text{g/l}$) que se halla dentro del rango 1500-5000 $\mu\text{g/l}$ publicado por Frank (1995) y superiores al rango de 1000-2000 $\mu\text{g/l}$ establecida por el fabricante (Analytic in Milch, 1998).

En leche de oveja, Molina *et al.* (2003) obtienen CD α más elevadas cuando utilizan el método BRT[®] AiM (6000 $\mu\text{g/l}$ de estreptomicina, 1200 $\mu\text{g/l}$ de gentamicina y 3700 $\mu\text{g/l}$ de neomicina). De igual forma, Althaus *et al.* (2002) detectan 10000 $\mu\text{g/l}$ de estreptomicina, 1200 $\mu\text{g/l}$ de gentamicina y 3300 $\mu\text{g/l}$ de neomicina con el método Delvotest[®] SP. Por su parte, Montero *et al.* (2005) al emplear el método Eclipse[®] 100ov detectan niveles elevados de gentamicina (3140 $\mu\text{g/l}$), kanamicina (18700 $\mu\text{g/l}$), neomicina (9100 $\mu\text{g/l}$) y estreptomicina (10100 $\mu\text{g/l}$) en leche de oveja.

De dichos resultados, se puede concluir que, de los cuatro aminoglucósidos analizados, solamente neomicina puede ser detectado a un nivel semejante a su LMR. Por ello, y a fin de mejorar la sensibilidad para el resto de los aminoglucósidos, Aureli *et al.* (1996) propone el uso de *Bacillus subtilis* como bacteria-test en placas de Petri, llegando a detectar 125 $\mu\text{g/l}$ de estreptomicina cuando se incorpora cisteína al medio de cultivo. Aunque se debe destacar que este ensayo de difusión en placas de Petri demora un tiempo de 24 horas en obtener la respuesta. Nagel (2009) mediante un bioensayo que utiliza *B. subtilis* BGA en microplacas ELISA detecta 660 $\mu\text{g/l}$ de residuos de gentamicina en leche de vaca.

- *Macrólidos*: Las CD α de los macrólidos calculados por Nagel (2009) a partir de las interpretaciones visuales del Bioensayo BT resultaron más bajos a los obtenidos para lecturas fotométricas (Tabla V.11) para eritromicina (210 $\mu\text{g/l}$), lincomicina (150 $\mu\text{g/l}$), espiramicina (3400 $\mu\text{g/l}$) y tilosina (74 $\mu\text{g/l}$). Según los resultados de la Tabla V.11, de los cuatro macrólidos estudiados, solamente lincomisina y tilosina presentaron capacidades de detección similares a sus LMRs establecidos por la UE.

Con respecto a eritromicina, las CD α para las lecturas visuales (210 $\mu\text{g/l}$) y fotométricas (350 $\mu\text{g/l}$) resultaron inferiores a las 1000, 2250 y 2500 $\mu\text{g/l}$ calculadas por Charm y Ruth (1993), Heeschen (1993) y Heeschen y Blüthgen (1995), respectivamente. Sin embargo, se debe destacar que Nagel (2009) cuando optimiza un bioensayo que emplea *B. subtilis* como microorganismo de prueba logra detectar 40 $\mu\text{g/l}$ de eritromicina en leche, además dicho bioensayo posee buena sensibilidad par los residuos de espiramicina (340 $\mu\text{g/l}$).

Tilosina, presentó una CD α (100 $\mu\text{g/l}$) próxima a los niveles 50 $\mu\text{g/l}$ (Charm y Ruth, 1993), 50-100 $\mu\text{g/l}$ (Frank, 1995) y 58-68 $\mu\text{g/l}$ (Zorraquino, 1997b, 1998) determinados para el método BRT[®] AiM.

En leche de oveja, Molina *et al.* (2003) detectan 630 $\mu\text{g/l}$ de eritromicina y 120 $\mu\text{g/l}$ de tilosina empleando el método BRT[®] AiM. Althaus *et al.* (2002) calculan CD α de 980 $\mu\text{g/l}$ de eritromicina y 120 $\mu\text{g/l}$ de tilosina para el método Delvotest[®] SP y Montero *et al.* (2005) obtienen 750 $\mu\text{g/l}$ de eritromicina, 18100 $\mu\text{g/l}$ de espiramicina y 230 $\mu\text{g/l}$ de tilosina para el método Eclipse[®] 100ov.

- *Quinolonas*: Las quinolonas presentan CD α muy elevadas en comparación con sus LMRs, no siendo detectadas por *G. stearothermophilus*, por ello Nows *et al.* (1999a,b) proponen el uso de *E. coli* ATCC 11303 como biosensor para la detección de estos residuos en leche, ya que dicho microorganismo posee muy buena sensibilidad, llegando a detectar 5 $\mu\text{g/l}$ de enrofloxacin, 175 $\mu\text{g/l}$ de flumequine y 8 $\mu\text{g/l}$ de marbofloxacin.

Müller y Jones (1993) también calculan una CD α elevada (desde 1000 hasta 2250 $\mu\text{g/l}$) para residuos de enrofloxacin en leche de vaca cuando emplean el método BRT[®] AiM. En leche de oveja, Montero *et al.* (2005) utilizan altas concentraciones de ciprofloxacina (5100 $\mu\text{g/l}$), enrofloxacin (4000 $\mu\text{g/l}$), flumequine (76200 $\mu\text{g/l}$) y norfloxacina (9500 $\mu\text{g/l}$) para ser detectadas por el método Eclipse[®] 100 ov con leche de

oveja. Nagel (2009) cuando emplea un bioensayo que contiene *B. subtilis* en un formato de microplacas ELISA logra detectar bajos niveles residuos de ciprofloxacina (160 µg/l), enrofloxacina (151 µg/l) y marbofloxacina (160 µg/l) y norfloxacina (360 µg/l) en leche.

V.2.2. Capacidad de detección del Bioensayo BS

V.2.2.1. Capacidades de detección de antibióticos betalactámicos con Bioensayo

BS: La Tabla V.12 muestra las ecuaciones obtenidas mediante la aplicación del modelo de regresión logística a los valores de absorbancias relativas de las lecturas fotométricas cuando el Bioensayo BS se emplea con muestras de leche fortificadas con antibióticos betalactámicos.

Tabla V.12. Coeficientes del modelo de regresión logística para las curvas dosis respuestas de las absorbancias relativas porcentuales del Bioensayo BS utilizado con penicilinas en leche

Betalactámicos	Logit [P] = $\beta_0 + \beta_1$ [Betalactámico]	C
<i>Penicilinas</i>		
Amoxicilina	Logit [P] = -3,1714 + 0,8278 [AMO]	81,5
Ampicilina	Logit [P] = -4,4413 + 1,2072 [AMP]	88,3
Cloxacilina	Logit [P]= -6,3575 + 0,1674 [CLOXA]	92,6
Oxacilina	Logit [P]= -4,4731 + 0,3049 [OXA]	87,5
Penicilina "G"	Logit [P]= -5,2547 + 1,6494 [PEN]	92,3
<i>Cefalosporinas</i>		
Cefadroxil	Logit [P]= -5,5445 + 0,0340 [CXL]	89,3
Cefalexina	Logit [P]= -5,5463 + 0,0391 [CLX]	91,3
Cefoperazone	Logit [P]= -4,6683 + 0,0434 [CPZ]	89,9
Ceftiofur®	Logit [P]= -3,3739 + 0,0439 [CFR]	86,7
Cefuroxime	Logit [P]= -3,5709 + 0,0290 [CFR]	86,7

AMO: amoxicilina, AMP: ampicilina, CLOXA: cloxacilina, OXA: oxacilina, PEN: penicilina, CXL: cefadroxil, CLX: cefalexina, CPZ: cefoperazone, CFR: ceftiofur, CFR: cefuroxime, C: concordancia porcentual.

Al igual que se observó para el Bioensayo BT, los valores de los coeficientes " β_1 " para las cinco penicilinas fueron más elevados que los calculados para las cinco cefalosporinas, señalando una mayor sensibilidad por parte de *G. stearothermophilus* para las primeras en comparación con las segundas. También, los coeficientes de concordancia alcanzados mediante el empleo del modelo logístico, fueron buenos con valores comprendidos entre 81,5% (amoxicilina) y 92,6% (cloxacilina).

Cuando se comparan los coeficientes " β_1 " obtenidos para las penicilinas con el Bioensayo BT (fortificado con CAP, Tabla V.4) con los valores del Bioensayo BS (fortificado con TMP, Tabla V.12) se observa que las penicilinas presentan mayores valores en el primer bioensayo (a excepción de la cloxacilina), mientras que para las cefalosporinas ocurre lo contrario (a excepción del cefadroxil). Este hecho podría atribuirse a una diferencia en la forma de acción de estos antimicrobianos (CAP y TMP) según se complementen con penicilinas o cefalosporinas en la leche.

Las Figura V.14 y Figura V.15 muestra las curvas dosis-respuesta para las absorbancias relativas porcentuales cuando el Bioensayo BS se emplea con muestras de leche fortificadas con penicilinas y cefalosporinas, respectivamente.

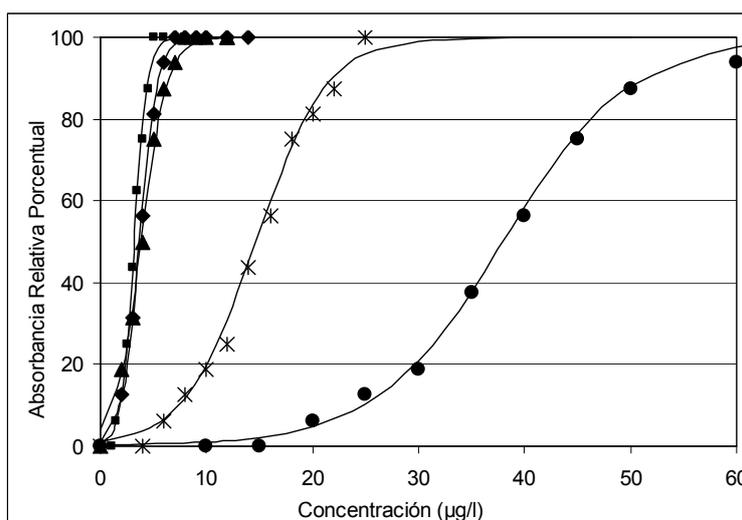


Figura V.14. Curvas dosis respuestas de penicilinas en leche analizadas por el Bioensayo BS. (■: penicilina, ▲: amoxicilina, ◆: ampicilina, ●: cloxacilina, x: oxacilina).

Mediante las ecuaciones logísticas de la Tabla V.12 se calcularon las capacidades de detección de los diez antibióticos betalactámicos (Tabla V.13) para el criterio del 45%. Al igual que Bioensayo BT, se observa que los CD_{45} son próximos a los LMRs para la mayorías de los betalactámicos ensayados (amoxicilina, ampicilina, cloxacilina, oxacilina, penicilina y ceftiofur®), no así para la cefalexina y cefoperazone que deben estar presentes a concentraciones superiores a sus LMRs.

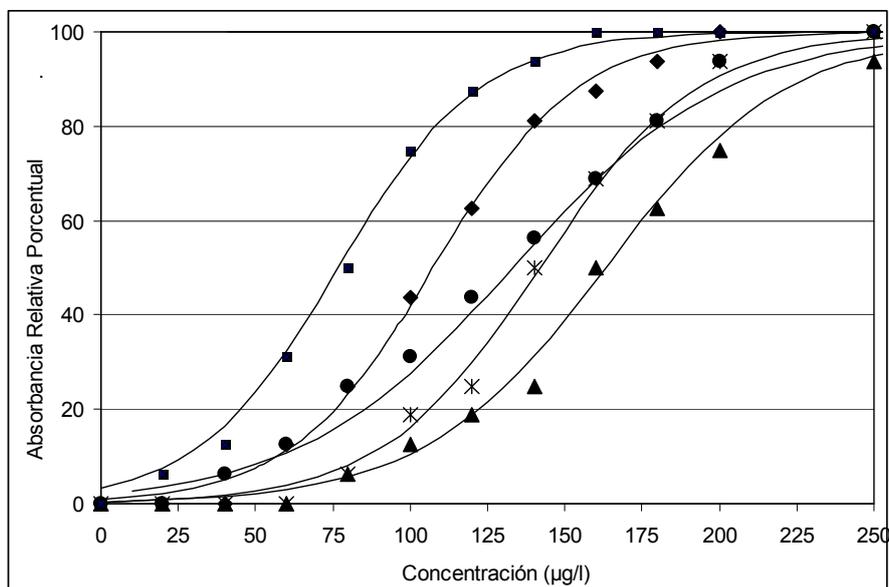


Figura V.15. Curvas dosis respuestas de cefalosporinas de leche analizadas por el Bioensayo BS. (▲: cefadroxil, x: cefalexina, ◆: cefoperazone, ●: cefuroxime, ■: ceftiofur®).

Las CD_{45} calculadas mediante la aplicación del modelo de regresión logística para las interpretaciones visuales del Bioensayo BS fueron similares para las cinco penicilinas (5 µg/l amoxicilina, 4 µg/l ampicilina, 40 µg/l cloxacilina, 16 µg/l oxacilina y 3 µg/l penicilina "G") y las cinco cefalosporinas (190 µg/l cefadroxil, 160 µg/l cefalexina, 94 µg/l cefoperazone, 115 µg/l ceftiofur® y 170 µg/l cefuroxime), según el trabajo de Nagel (2009).

Tabla V.13. Capacidades de detección de antibióticos betalactámicos en leche mediante el bioensayo BS

Betalactámicos	CD $\alpha_{45\%}$	CD α_{visual}^*	LMR
<i>Penicilinas</i>			
Amoxicilina	5	5	4
Ampicilina	4	4	4
Cloxacilina	42	40	30
Oxacilina	17	16	30
Penicilina "G"	4	3	4
<i>Cefalosporinas</i>			
Cefadroxil	180	190	-
Cefalexina	150	160	100
Cefoperazone	120	94	50
Ceftiofur [®]	90	115	100
Cefuroxime	140	170	-

CD α : Capacidad de detección, LMR: Límite Máximo de Residuo, *. Nagel (2009).

Para otros métodos de inhibición microbiológica, las CD α de amoxicilina, ampicilina y cloxacilina resultaron similares a los valores reportados por Jaskch, (1988), Charm y Ruth (1993) Heeschen (1993), Heeschen y Blüthgen (1995), Zorraquino (1997b, 1998) y Molina *et al.* (2003) para el método BRT[®] AiM, que también utiliza negro brillante como indicador redox con muestras de leche de vaca. En forma similar, al utilizar el método de inhibición microbiológica Delvotest[®] SP, Jaskch (1988), Van Os y Beukers (1989), Tramontin *et al.*(1992), Charm y Ruth (1993), Heeschen (1993), Heeschen y Blüthgen (1995), Honkanen-Buzalski y Reybroech (1995). Del mismo modo, Lacroix (1995), Gardner *et al.* (1996), Luitz *et al.* (1996), Sischo (1996) y Althaus *et al.* (2002)determinan CD α para las penicilinas similares a los valores de la Tabla V.13.

Penicilina "G", por su parte, presentó CD α inferiores al rango 6 a 10 $\mu\text{g/l}$ señalados por Jaskch (1988), Charm y Ruth (1993) y Heeschen (1993) para el bioensayo BRT[®] AiM que contiene el mismo indicador redox, pero las CD α (Tabla IV.13) fueron similares a los

valores reportados por Tramontin *et al.* (1992), Charm y Ruth (1993), Honkanen-Buzalski y Reybroech (1995), Lacroix (1995), Gardner *et al.* (1996), Sicho (1996) y Zaadhof *et al.* (1997) para el método Delvotest[®] SP.

Respecto a las cefalosporinas, las CD α de la Tabla V.13 resultaron similares a los niveles calculados para ceftiofur[®] (Charm y Ruth, 1993, Molina *et al.*, 2003), cefoperazone (Jaskch, 1988; Zorraquino, 1997b, 1998; Molina *et al.*, 2003), cefalexina (Zorraquino, 1997b, 1998; Molina *et al.*, 2003), cefadroxil y cefuroxime (Molina *et al.*, 2003) para el método BRT[®] AiM. Aunque, al emplear el método Delvotest[®] SP, Charm y Ruth (1993), Honkanen-Buzalski y Reybroech (1995), Lacroix (1995), Gardner *et al.* (1996), Sicho (1996) y Althaus *et al.* (2002, 2003) obtienen CD α levemente inferiores a los calculados para el Bioensayo BS.

V.2.2.2. Capacidades de detección de tetraciclinas con Bioensayo BS: La Tabla V.14 resume los resultados de la aplicación del modelo logístico a las lecturas fotométricas de las curvas dosis-respuestas de las tetraciclinas en leche analizadas mediante el Bioensayo BS. Los coeficientes de concordancia fueron adecuados, al estar comprendidos entre 87,6% para clortetraciclina y el 92,1% para la tetraciclina. Los términos " β_1 " resultaron bajos, en comparación con los obtenidos para los antibióticos betalactámicos (Tabla V.12) y las mismas tetraciclinas analizadas con el Bioensayo BT (Tabla V.6). Esta virtud, permitirá disminuir los problemas asociados a una especificidad cruzada de estos antibióticos con el Bioensayo BT.

La Figura V.16 presenta el efecto de las concentraciones de tetraciclinas sobre las absorbancias relativas porcentuales cuando el Bioensayo BS se utiliza con muestras de leche fortificadas con estos antibióticos. Resulta evidente la menor pendiente en el crecimiento de clortetraciclina, con respecto a las otras oxitetraciclina y tetraciclina.

Tabla V.14. Coeficientes del modelo de regresión logística para las curvas dosis respuestas de las absorbancias relativas porcentuales del Bioensayo BS utilizado con tetraciclinas en leche

Tetraciclinas	Logit [P] = $\beta_0 + \beta_1$ [TCs]	C
Clortetraciclina	Logit [P] = -3,4948 + 0,00123 [CTC]	87,6
Oxitetraciclina	Logit [P] = -3,6682 + 0,00685 [OTC]	89,6
Tetraciclina	Logit [P]= -4,4052 + 0,00816[STZ]	92,1

TCs: Tetraciclinas, CTC: clortetraciclina, OTC: oxitetraciclina, TC: tetraciclina.

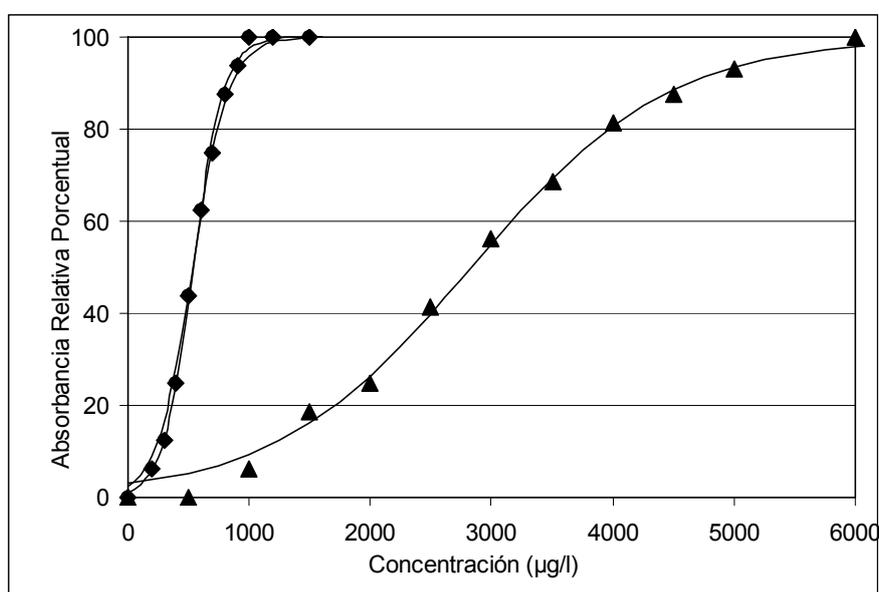


Figura V.16. Curvas dosis respuestas de tetraciclinas de leche analizadas por el Bioensayo BS. (▲: clortetraciclina, ◆: tetraciclina, ●: oxitetraciclina)

Las CD_{α} calculadas mediante las ecuaciones logísticas de la Tabla V.14 y el criterio del 45% se muestran en la Tabla V.15. Se observa que clortetraciclina presentó CD_{α} más elevados que oxitetraciclina y tetraciclina. Este hecho obedece al menor valor del coeficiente " β_1 " de la CTC (0,00123) en comparación con la oxitetraciclina (0,00685) y la tetraciclina (0,00816).

Tabla V.15. Capacidades de detección de tetraciclinas en leche mediante el bioensayo BS

Tetraciclinas	CD $\alpha_{45\%}$	CD α_{visual}^*	LMR
Clortetraciclina	3300	3600	100
Oxitetraciclina	630	850	100
Tetraciclina	620	720	100

CD: Capacidad de detección, LMR: Límite Máximo de Residuo, *: Nagel (2009).

Al respecto, se debe destacar que otros bioensayos que utilizan Müller Hinton como medio de cultivo e indicador de óxido-reducción Negro Brillante también presentan altos niveles de detección para las tetraciclinas, como por ejemplo el método BRT[®] AiM que detecta 2000-5000 $\mu\text{g/l}$ de tetraciclina (Frank, 1995) o 1500-5000 $\mu\text{g/l}$ de oxitetraciclina (Frank, 1995). De igual forma, Molina *et al.* (2003) detectan valores elevados (5500 $\mu\text{g/l}$ de oxitetraciclina y 6200 $\mu\text{g/l}$ de tetraciclina) al emplear el método BRT[®] AiM con muestras de leche de oveja.

Cuando se comparan las CD α del Bioensayo BT (Tabla V.7) de las tetraciclinas con las capacidades de estos antibióticos calculados para el Bioensayo BS (Tabla V.15), se aprecia que el primer método posee mayor sensibilidad que el segundo. De este modo, estos antibióticos serán detectados por Bioensayo BT y no por Bioensayo BS, eliminando de este modo el problema de especificidad cruzada.

V.2.2.3. Capacidades de detección de sulfamidas con Bioensayo BS: La Tabla V.16 muestra las ecuaciones logísticas calculadas cuando el Bioensayo BS se utiliza con muestras de leche enriquecidas con sulfamidas. Los ajustes fueron buenos, con concordancias porcentuales comprendidas entre 86,3% (sulfametoxazol) y 88,8% (sulfadiazina). Además, los valores de los coeficientes " β_1 " fueron buenos en comparación con los obtenidos para Bioensayo BT (Tabla V.8) que no contiene trimetoprim en el medio

de cultivo. Esta ventaja pone de manifiesto mejora en la sensibilidad del método para detectar residuos de sulfamidas en la leche.

Tabla V.16. Coeficientes del modelo de regresión logística para las curvas dosis respuestas de las absorbancias relativas porcentuales del Bioensayo BS utilizado con sulfamidas en leche

Sulfamidas	Logit [P] = $\beta_0 + \beta_1$ [SAs]	C
Sulfadiazina	Logit [P] = -2,9629 + 0,0339 [SDA]	88,8
Sulfadimetoxina	Logit [P] = -3,3825 + 0,00839 [SDM]	86,8
Sulfametazina	Logit [P]= -1,8302 +0,00689 [SMT]	88,5
Sulfametoxazol	Logit [P]= -0,9513 + 0,02020 [SMX]	86,3
Sulfatiazol	Logit [P]= -1,4983 +0,01840 [STZ]	86,9

SAs: sulfamidas, SDZ: sulfadiazina, SDM: sulfadimetoxina, SMZ: sulfametazina, SMX: sulfametoxazol, STZ: sulfatiazol, C: concordancia porcentual.

La Figura V.17 permite visualizar el efecto de las concentraciones de sulfamidas en leche sobre las absorbancias relativas porcentuales del Bioensayo BS. Se observa que sulfadiazina, sulfametoxazol y sulfatiazol presentaron mayor pendiente de ascenso que sulfadimetoxina y sulfametazina, debido a una mayor efecto sinérgico del trimetoprim presente en el medio de cultivo y una mejor sensibilidad de *G. stearothermophilus* para estos antimicrobianos.

Las CD α de las cinco sulfamidas estudiadas se resumen en la Tabla V.17. Se aprecia que sulfadiazina, sulfametoxazol y sulfatiazol presentaron niveles de detección similares al LMR, mientras que sulfadimetoxina y sulfametazina poseen límites superiores.

Además, dichas CD α resultan similares a las calculadas para otros métodos de inhibición microbiológicos que utilizan *G. stearothermophilus* e incorporan antifolatos en su composición, como por ejemplo el método Delvotest[®] "SP" que permite detectar 260 $\mu\text{g/l}$ de sulfadimetoxina y 110 $\mu\text{g/l}$ de sulfametoxazol en leche de oveja (Althaus *et*

al.,2002). Aunque, Charm y Ruth (1993) señalan un nivel de detección de 1000 µg/l para residuos de sulfatiazol en leche de vaca para este método.

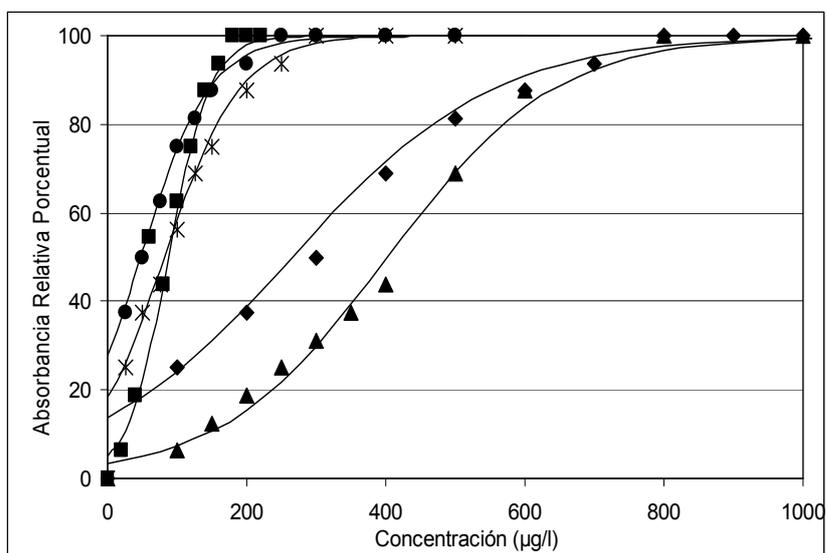


Figura V.17. Curvas dosis respuestas de sulfamidas en leche analizadas por el Bioensayo BS. (■: sulfadiazina, ▲: sulfadimetoxina, ●: sulfametoxazol, x: sulfatiazol, ◆: sulfametazina).

Tabla V.17. Capacidades de detección de sulfamidas en leche mediante el Bioensayo BS

Sulfamidas	CD $\alpha_{45\%}$	CD α_{visual}^*	LMR
Sulfadiazina	106	164	100
Sulfadimetoxina	477	260	100
Sulfametazina	355	610	100
Sulfametoxazol	78	120	100
Sulfatiazol	115	100	100

CD α : Capacidad de detección, LMR: Límite Máximo de Residuo, *: Nagel (2009).

El método microbiológico Eclipse® "100ov" cuando se utiliza con leche de oveja detecta 170 µg/l de sulfadimetoxina, 750 µg/l de sulfametoxazol y 250 µg/l de sulfatiazol (Montero *et al.*, 2004), valores muy cercanos a las CD_α calculadas en la Tabla V.17.

V.2.2.4. Capacidades de detección de otros antimicrobianos con Bioensayo BS: Los modelos logísticos que expresan los cambios en las frecuencias de resultados positivos y las absorbancias relativas como una función de los niveles de aminoglucósidos, macrólidos y quinolonas se resumen en la Tabla V.18.

Tabla V.18. Coeficientes del modelo de regresión logística para las curvas dosis respuestas de las calificaciones visuales y fotométricas del bioensayo BS utilizado con otros antimicrobianos en leche

Antimicrobianos	Logit [P] = $\beta_0 + \beta_1$ [Antimicrobianos]	C
<i>Aminoglucósidos</i>		
Gentamicina	Logit [P] = -3,2392+0,00547 [GEN]	87,8
Kanamicina	Logit [P] = -2,6211+0,00061 [KAN]	75,8
Neomicina	Logit [P]= -4,6230+0,00486 [NEO]	93,8
Estreptomicina	Logit [P]= -17,3530+0,00950 [EST]	97,9
<i>Macrólidos</i>		
Eritromicina	Logit [P]= -1,3677+0,00511 [ERI]	73,2
Lincomicina	Logit [P]= -1,0322+0,00473 [CXL]	83,0
Espiramicina	Logit [P]= -1,6090+0,00096 [CLX]	84,6
Tilosina	Logit [P]= -1,0328+0,0199 [CPZ]	74,5
<i>Quinolonas</i>		
Ciprofloxacina	Logit [P]= -4,6805+0,0017 [CIPRO]	98,4
Enrofloxacina	Logit [P]= -2,0371+0,00157 [ENRO]	74,6
Marbofloxacina	Logit [P]= -1,7160+0,00061 [MAR]	74,5
Norfloxacina	Logit [P]= -11,5749+ 0,00205 [NOR]	73,8

Los ajustes fueron adecuados para el modelo logístico, con coeficientes de concordancias comprendidos entre 73,2% (eritromicina) y 98,4% (ciprofloxacina).

Al igual que sucedió con Bioensayo BT, los coeficientes " β_1 " de kanamicina, estreptomycin, espiramicina, ciprofloxacina, enrofloxacin, marbofloxacina y norfloxacina fueron bajos en comparación con el resto de antibióticos de la Tabla V.18 y los observados para las penicilinas. Este hecho obedece a la baja sensibilidad de *G. stearothermophilus* para detectar estos antibióticos.

Las curvas dosis-respuestas para aminoglucósidos (Figura V.18), macrólidos (Figura V.19) y quinolonas (Figura V.20) permiten visualizar el efecto de sus concentraciones de los diferentes antimicrobianos en leche sobre las absorbancias relativas porcentuales del Bioensayo BS. Se observa que la curva de kanamicina crece más suave que el resto de aminoglucósidos, debido a su menor valor del coeficiente " β_1 " (0,00061).

Un comportamiento similar presenta la espiramicina en el grupo de los macrólidos. Con respecto a las quinolonas, *G. stearothermophilus* presenta baja sensibilidad para su detección, ya que se requieren grandes incrementos en sus concentraciones para producir un cambio en la respuesta de color del Bioensayo BS (Figura V.20). Por este motivo, algunos autores (Fuselier *et al.*, 1999; Gaudin *et al.*, 2001, Nouws *et al.*, 1999a,b) proponen el uso de *Escherichia coli* como bacteria-test para analizar residuos de quinolonas.

Las CD α calculadas mediante el modelo logístico se resumen en la Tabla V.19. El Bioensayo BS posee buena sensibilidad para detectar residuos de neomicina y tilosina en comparación con sus LMRs, mientras que los residuos de eritromicina y gentamicina deben encontrarse a niveles mayores a sus LMRs para poder detectarse con el Bioensayo BS. El resto de antimicrobianos de la Tabla V.19 no pueden detectarse mediante este método.

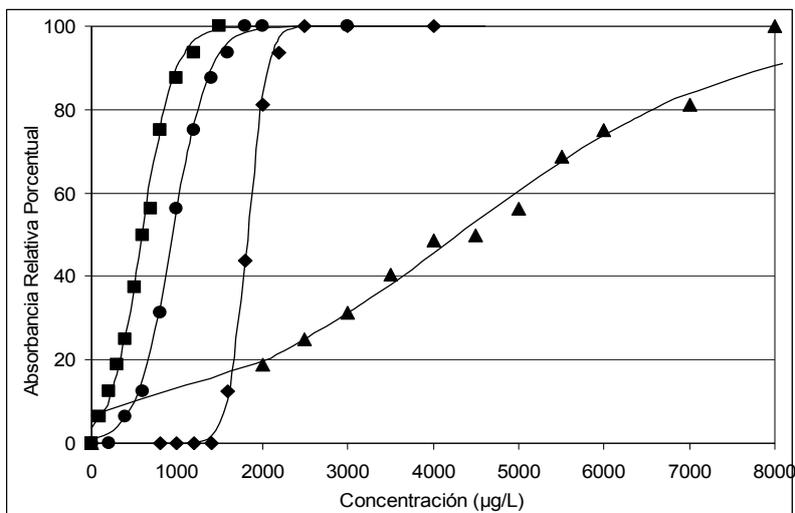


Figura V.18. Curvas dosis respuestas de aminoglucósidos en leche analizadas por el Bioensayo BS. (■: gentamicina, ▲: kanamicina, ◆: neomicina, ●: estreptomicina).

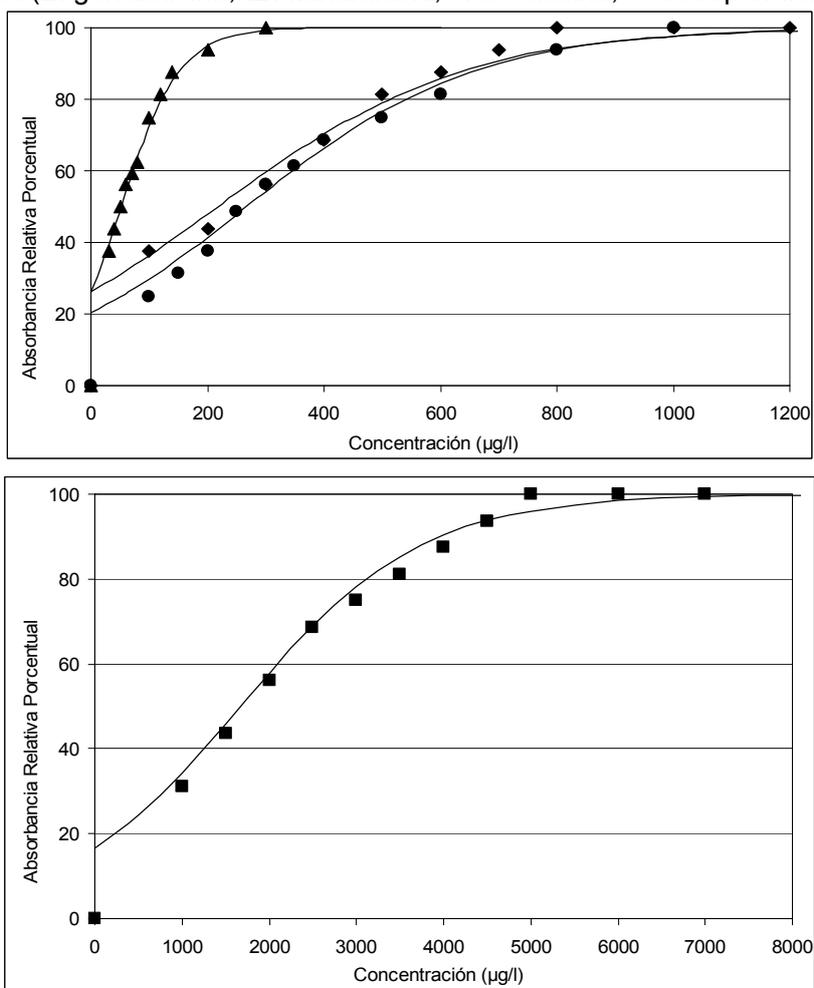


Figura V.19. Curvas dosis respuestas de macrólidos en leche analizadas por el Bioensayo BS. (▲: tilosina, ◆: eritromicina, ●: lincomicina, ■: espiramicina).

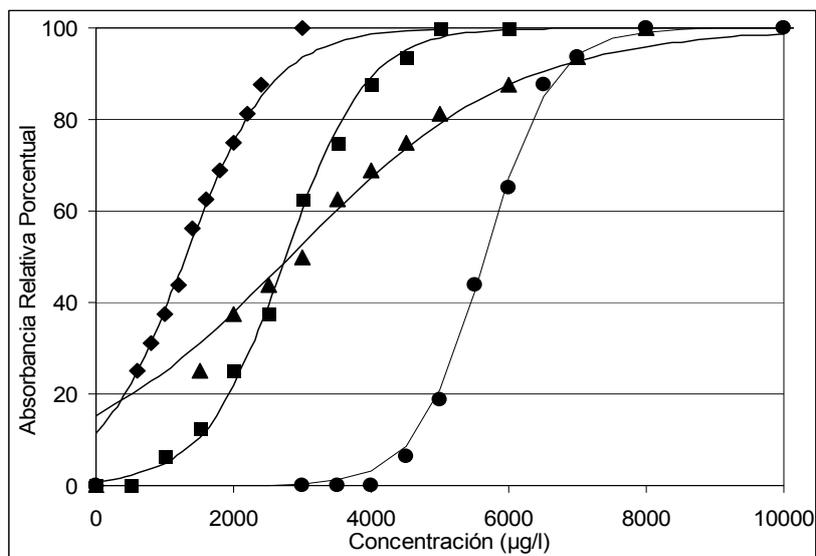


Figura V.20. Curvas dosis respuestas de quinolonas en leche analizadas por el Bioensayo BS. (■: ciprofloxacina, ◆: enrofloxacin, ▲: marbofloxacina, ●: norfloxacina).

Además, al comparar los $CD_{\alpha_{45\%}}$ con los obtenidos por Nagel (2009) se observa que son resultan similares. Por ello, el criterio del 45% de las absorbancias relativas porcentuales resulta adecuado para sustituir el ojo humano por un equipo de lectura óptica. En un futuro, se intentará crear un software capaz de transformar automáticamente la lectura colorimétrica del bioensayo por una respuesta electrónica de forma tal de clasificar una muestra como negativa o positiva.

Por último se debe mencionar que el análisis de muestras de leche por este sistema microbiológico (dos bioensayos) constituye un instrumento más eficaz en el actual control de residuos utilizados en los planes de trazabilidad, ya que una muestra de leche que fue analizada por dos métodos microbiológicos en forma simultánea, tendrá menos probabilidades de ocasionar problemas en los procesos fermentativos de las industrias lácteas, acompañado de un control más riguroso que contribuye sin lugar a dudas, a mejorar la inocuidad a lo largo de la cadena alimentaria.

Tabla V.19. Capacidad de detección de otros antimicrobianos en leche mediante el Bioensayo BS

Antimicrobianos	CD $\alpha_{45\%}$	CD α_{visual} *	LMR
<i>Aminoglucósidos</i>			
Gentamicina	700	530	100
Kanamicina	5300	6200	150
Neomicina	1100	1200	1500
Estreptomina	1900	3600	200
<i>Macrólidos</i>			
Eritromicina	390	190	40
Lincomicina	350	220	150
Espiromicina	2300	2600	200
Tilosina	83	50	50
<i>Quinolonas</i>			
Ciprofloxacina	3120	1710	100
Enrofloxacina	1700	2300	100
Marbofloxacina	3800	4400	75
Norfloxacina	7100	5900	-

CD α : Capacidad de detección, LMR: Límite Máximo de Residuo. *: Nagel (2009)

VI. CONCLUSIONES

De los resultados de este trabajo se deducen una serie de conclusiones respecto a la implementación de un lector óptico para el análisis cuantitativo del sistema microbiológico ResScreen[®], que se detallan a continuación:

1. Determinación de los puntos de corte (*cut off*) del sistema microbiológico ResScreen[®]: Debido a la diferencia en la composición e indicadores empleados en los Bioensayos BT y BS, se establecieron los siguientes valores de densidades ópticas de corte:

I. Bioensayo BT: 0.84 unidades de densidades ópticas con una especificidad de 0.944 y una sensibilidad de 0.942.

II. Bioensayo BS: 0.86 unidades de densidades ópticas con una especificidad de 0.971 y una sensibilidad de 0.968.

2. Los criterios calculados para los Bioensayos BT (49 %) y BS (48 %) resultan cercanos al criterio del 45 % utilizado comúnmente para los métodos de screening de inhibición microbiológica.

3. Las capacidades de detección calculadas mediante el criterio del 45 % de las absorbencias relativas porcentual fueron las siguientes:

I. El Bioensayo BT permite detectar residuos de amoxicilina, ampicilina, cloxacilina, oxacilina, penicilina "G", cefalexina, cefoperazone, ceftiofur[®],

clortetraciclina, oxitetraciclina, tetraciclina, neomicina, lincomicina y tilosina a niveles cercanos a los LMRs.

II. Bioensayo BS permite detectar residuos de amoxicilina, ampicilina, cloxacilina, oxacilina, penicilina "G", cefalexina, cefoperazone, ceftiofur®, sulfadiazina, sulfadimetoxina, sulfametazina, sulfametoxazol, sulfatiazol, neomicina, lincomicina y tilosina a niveles similares a sus LMRs.

Con el propósito de lograr una detección de residuos de antibióticos en leche más eficiente, en un futuro, resultaría interesante llevar a cabo el diseño y la optimización de nuevos bioensayos que utilicen otros microorganismos de prueba tales como *Bacillus megaterium* o *Bacillus pumilus*. De esta manera se pretende utilizar un sistema de bioensayos específicos para diferentes familias de antimicrobianos de respuestas dicotómicas, de más fácil empleo, económicos y que permitan detectar un elevado número de residuos de antibióticos en la leche y, de este modo, colaborar con uno de los principios de la Seguridad Alimentaria que es la protección del consumidor.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Abraham, E. 1987. Cephalosporins, 1945-1986. *Drugs*. 34: 1-14.

Abriouel, H.; Ben Omar, N.; Lucas López, R.; Gálvez, A. 2008. La doble faceta del género *Enterococcus*, y su importancia en alimentos. *Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental*. 21(1): 154-168.

Acar, J. F.; Goldstein, F. W. 1997. Trends in bacterial resistance to fluoroquinolones. *Clin. Infect. Dis.* 24(1): S67-73.

Adams, R. 2001. *Veterinary pharmacology and therapeutics*. Iowa State University Press, Iowa, USA, pp.: 1069.

Agarwal, V. K. 1992. High-performance liquid chromatographic methods for the determination of sulfonamides in tissues, milk and eggs. *J. Chromatogr.* 624: 411-423.

Aguilera, E., Lucena, R., Cardenas, S., Valcarcel, N., Trullols, E., Ruisanchez, I. 2006. Robustness in qualitative analysis: a practical approach. *Trends in Analytical Chemistry*. 25 (6): 621-627.

Aiello, S. E. 1998. *Veterinary Merck Index*, Merck, Washington DC, USA: pp.1779.

Allison, J. R. D. 1985. Antibiotic residues in milk. *British Veterinary Journal*. 141: 9-16.

Alós Cortés, J. A.; Arias Silgo, F.; Egocheaga Cabello, I.; Gómez Garcés, J. L.; López Madroño, C.; Marmesat Guerrero, F.; Oteo Iglesias, J.; Pérez Gómez, A.; Ripoll Lozano, M. A. 2004. Telitromicina: un nuevo antibiótico. *Revista de SEMG*. 60: 33-38.

Althaus, R.; Molina, M. P. 1999. "Influencia del tiempo sobre el análisis de los componentes del sistema lactoperoxidasa en la leche de oveja. I.T.E.A. (Información Técnica Económica Agraria). 20 (I): 155-157.

Althaus, R.; Molina, M.; Rodríguez, M.; Fernández, N. 2001a. Evaluation of the BRT method for detection of betalactams antibiotics in ewe milk. *Milchwissenschaft*. 56 (10): 568-572.

- Althaus, R.; Molina, M.; Rodríguez, M.; Fernández, N. 2001b. Detection limits of betalactams antibiotics in ewe milk by Penzym® enzymatic test. *J. Food Prot.* 64: 1844-1847.
- Althaus, R.; Peris, C.; Montero, A.; Torres, A.; Molina, P. ; Fernandez, N. 2002. Detection limits of antimicrobial agents in ewe milk by Delvotest®. *Milchwissenschaft.* 57: 660-664.
- Althaus, R.; Molina, M.; Peris, C.; Torres, A.; Fernández, N. 2003. Accuracy of BRT and Delvotest Microbial inhibition test as affected by composition of ewe's milk. *J. Food Prot.* 66: 473-478.
- Althaus, R.L.; Nagel, O.N. 2006. Bioensayo para la identificación de agentes antimicrobianos en muestras fluidas y método de identificación de dichos agentes antimicrobianos. Argentina. Nº de solicitud: p-060104535 del 18 de octubre.
- Althaus, R.; Berruga, M.; Montero, A.; Roca, M.; Molina, M. 2009. Evaluation of a Microbiological Multi-Residue System on the detection of antibacterial substances in ewe Milk. *Anal.Chim.Acta.*632: 156-162.
- Analytic in Milch. 1998. The Brilliant Black Redution Test (BRT) Background and basic information 3/98. Informe Técnico Analytik in mich productions und Vertriebs-GmbH: 4.
- Anthony, F.; Acar, J.; Franklin, A.; Gupta R.; Nicholls, T.; Yamura, S.; Thompson, S.; Threlfal, I; Vose, D.; Van Vuuren, M.; White, D. 2001. Antimicrobial resistance: responsible and prudent use of antimicrobial agents in veterinary medicine. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 20: 829-839.
- Aparicio, P.; Rodríguez, E.; Gárate, T.; Molina, R.; Sotoa, A.; Alvara, J. 2003. Terapéutica Antiparasitaria. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 21(10): 579-94.
- Aureli, P.; Ferrini, A.; Mannoni, V. 1996. Presumptive identification of sulfonamide and antibiotic residues in milk by microbial inhibitors tests. *Food Control.* 7: 165-168.
- Barnas, G.; Nimphius, N. 1996. Antibiotic Guide. Wiscosin, Medical College. Disponible en: <http://www.interned...g/antibiotics.html>), 10 de diciembre de 2010

- Bennish, M. L.; Salam, M. A.; Hossain, J.; Myaux, J.; Chakraborty, F.; Henry, J.; Ronsmans, C. 1992. Antimicrobial resistance of *Shigella* isolates in Bangladesh, 1983-1990: increasing frequency of strains multiply resistant to ampicillin, trimethoprim-sulfamethoxazole and nalidixic acid. *Clin. Infect. Dis.* 14: 1055-1060.
- Berruga, M. I.; Molina, M. P.; Noves, B.; Roman, M. and Molina, A. 2007. In Vitro study about the effect of several penicillins during the fermentation of yogurt made from ewe's milk. *Milchwissenschaft.* 62: 303-305.
- Betriu, C.; Rodríguez-Avial, I.; Ali Sánchez, B.; Gómez, M.; Álvarez, J.; Picazo, J. 2002. In Vitro Activities of Tigecycline (GAR-936) Against Recently Isolated Clinical Bacteria in Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 892-895.
- Bevill, R. F. 1984. Sulphonamides. In: Jukes TH, Dupont HL, Crawford LM, editors. *CRC Handbook Series In zoonoses, Section D, Antibiotics, sulphonamides, and public health.* Boca Raton, FL: CRC Press. p. 355–365.
- Bevill, R. 1989. Sulfonamide Residues in Domestic Animals. *J. Vet. Phar. Ther.* 12: 241-246.
- Bishop, J. R.; Bodine, A. B.; O'Dell, G.D.; and Janzen, J.J. 1984. Retention Data for Antibiotics Commonly Used for Bovine Infections. *J. Dairy Sci.* 67: 437-440.
- Bishop, J.; White, C. 1984. Antibiotic residue detection in milk. A review. *J. Food Prot.* 47: 647-652.
- Bishop, J.; Bodine, A.; O'Dell, G.; Janzen, J. 1985. Quantitative assay for antibiotics used commonly in treatment of bovine infections. *J. Dairy Sci.* 68: 3031-3036.
- Borcherding, S. M.; Stevens, R.; Nicholas, R. A.; Corley, C. R.; Self, T. 1996. Quinolones: a practical review of clinical uses, dosing considerations, and drug interactions. *J. Farm. Pract.* 42: 69-78.

- Botsoglou, N. and Fletouris, J. 2001. Drugs residues in foods: Pharmacology, food safety, and analysis. En: Serie Food Science and technology. ed. Marcel Dekker, Inc. New York, USA.
- Bowman, W.; Raud, M. 1987. Coloraciones Bacterianas. En: Farmacología: Bases Químicas y Patológicas. 2 Edición, Editorial Científico-Técnica, La Habana, Cuba, 13: 6-16.
- Bozdogan, B.; Berrezouga, L.; Kuo, M.; Yurek, D.; Farley, K.; Stockman, B.; Leclercq, R. 1999. A New Resistance Gene, *lin B*, Conferring Resistance to Lincosamides by Nucleotidylation in *Enterococcus faecium* HM1025. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. p. 925–929.
- Bradley, A. J.; Green, M. D. 2009. Factors affecting cure when treating bovine clinical mastitis with cephalosporin-based intramammary preparations. *J. Dairy Sci.* 92: 1941-1953.
- Brighty, K. E.; Gootz, T. D. 1997. The chemistry and biological profile of trovafloxacin. *J. Antimicrob. Chemother.* 39 (B):1-14.
- Brouillet, P. 1994. "Maître de la présence d'inhibiteurs dans le lait". *Recueil de Médecine Vétérinaire. Spécial Qualité du lait.* 443-455.
- Brugueras, M.; Morejón García, M. 1998. Antibacterianos de Acción Sistémica. Parte II. Otros Grupos de Antibióticos. *Rev. Cubana Med. Gen. Integr.* 14(4): 362-373.
- Brunner, H.; Zeiler, H. J. 1988. Oral ciprofloxacin treatment for *Salmonella typhimurium* infection of normal and immunocompromised mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32: 57–62.
- Bryan, C. S. 1951. Problems Created for the Dairy Industry by Antibiotic Mastitis Treatment. *Mich. Agr. Expt. Sta., Quart. BMI.* 33: 223.

Bryskier, A.; Agouridas, C.; Gasc, J. 1993a. Classification of Macrolide Antibiotics. En: Bryskier AJ, Butzler JP, Neu HC, Tulkens PM, Eds. Macrolides, Chemistry, Pharmacology and Uses Clinical Editorial Arnette Blackwell, Paris, France, 5-66.

Bryskier, A.; Agouridas, C.; Chantot, J.F. 1993b. Structure and activity. In: Neu HC, Young LS, Zinner SH (eds): The new macrolides, azalides and streptogramins, pharmacology and clinicals applications, Editorial Marcel Dekker, New York, USA, pp.: 3-8.

Btosoglou, N.; Fletouris, D. 2001. Drug Residues in Foods: Pharmacology, Food Safety, and Analysis. Editorial Marcel Dekker. New York, USA, pp. 1194.

Busani, L.; Graziani, C.; Franco, A.; Di Egidio, A.; Grifoni, G.; Formato, G.; Sala, M.; Binkin, N.; Battisti, A. 2003. Antibiotic Use in Cattle Farms: Results of a Survey Among Veterinarians. Bolletino Epidemiologico Nazionale (BEN).16: n° 7-8.

Busani, L.; Graziani, C.; Franco, A.; Di Egidio, A.; Binkin, N.; Battisti, A. 2004. Survey of the Knowledge, Attitudes and Practice of Italian Beef and Dairy Cattle Veterinarians Concerning the Use of Antibiotics. Veterinary Record.,155: 733-738.

CAA (Código Alimentario Argentino). 2001. Capítulo VIII: Alimentos Lácteos (artículos artículos 555, 556, 556 bis). Decreto 2126/71 del Código Alimentario Argentino.

Calderwood, S.; Moellering, R. Jr. 1990. Principles of anti-infective therapy. En: Stein J.H. Internal medicine. 3 ed. Boston: Little Brown. 1202-1218.

Carlsson, A.; Bjorck, L. 1989. Detection of antibiotic residues in herd and tanker milk A study of the Charm test II. Milchwissenschaft, 44 (1): 7-10.

CEE (Comunidad Económica Europea). 1990. Decisión No. 2377/90. Procedimiento para establecer los límites máximos de residuos de productos medicinales veterinarios en alimentos de origen animal. 26 de junio de 1990. Diario Oficial de la Comunidad Europea (DOCE) N° L224:1-8.

CEE (Comunidad Económica Europea). 1992a. Decisión No. 675/92. Anexos I y III de la CEE (Comunidad Económica Europea). Decisión No. 2377/90: Procedimiento para

establecer los límites máximos de residuos de productos medicinales veterinarios en alimentos de origen animal. 18 de Marzo 1992. Diario Oficial de la Comunidad Europea (DOCE) N° L73: 8-14.

CEE (Comunidad Económica Europea). 1992b. Decisión No. 3093/92. Anexo III de la CEE (Comunidad Económica Europea). Decisión No. 2377/90: Procedimiento para establecer los límites máximos de residuos de productos medicinales veterinarios en alimentos de origen animal. 27 de octubre 1992. Diario Oficial de la Comunidad Europea (DOCE) N° L311: 18-19.

CEE (Comunidad Económica Europea). 1993. Diario Oficial de la Comunidad Europea (DOCE). Directiva 93/257/CEE del Consejo del 15 de abril de 1993, L118: 75-79.

CEE (Comunidad Económica Europea). 1996. Decisión No. 3093/92. Anexo III de la CEE (Comunidad Económica Europea). Decisión No. 2377/90: Procedimiento para establecer los límites máximos de residuos de productos medicinales veterinarios en alimentos de origen animal. 27 de abril 1996. Diario Oficial de la Comunidad Europea (DOCE) N° L125: 10-32.

CEE (Comunidad Económica Europea). 2001. Recomendación CEE/77/2001 del Consejo, de 15 de noviembre de 2001, sobre la utilización prudente de los agentes antimicrobianos en la medicina humana. DOCE. L. 34: 13-16.

CEE (Comunidad Económica Europea). 2002. Decisión CCE/657/2002 del Consejo del 12 de Agosto de 2002 por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados. DOCE. L. 73: 30-31.

Chambers, H. F.; Sande, M. A. Antimicrobial agents: the aminoglycosides. 1995. Eds. Hardman, J. G.; Limbird, L. E.; Molinoff, P.B.; Ruddon, R. W.; Goodman Gilman, A. The Pharmacological Basis of Therapeutics. Editorial Mc Graw-Hill, New York, USA, pp.: 103-1021.

Charm, S.; Ruth, G. 1993. Advances in Charm technology for Antimicrobial residues in milk. 32-46. En: Inhibitory substances in milk-current analytical practice. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica. IDF Bull. N° 283.

Charm, S.; Zomer, E. 1995. The evolution and direction of rapid detection/identification of antimicrobial drug residues. 224-233. En: Residues of Antimicrobial Drugs and Other Inhibitors in Milk. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica. IDF S. I. N° 9505.

Chysky, V.; Kapila, K.; Hullmann, R.; Arcieri, G.; Schacht, P.; Echols, R. 1991. Safety of ciprofloxacin in children: worldwide clinical experience based on compassionate use. Emphasis on joint evaluation. *Infection*. 19: 289-296.

Chopra, I. 2002. New Developments in Tetracycline Antibiotics: Glycylcyclines and Tetracycline Efflux Pump Inhibitors. *Drug Resist. Updat.* 5: 119-125.

Codex Alimentarius, 1996. Residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos. Codex Alimentarius, 3. Programa conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias, FAO. Roma, Italia.

Codex Alimentarius, 2007. Examen de la labor realizada por la FAO, OMS y OIE sobre la resistencia a los antimicrobianos. Codex Alimentarius, 3. Programa conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias. FAO. Roma, Italia.

Cordiés Jackson, L.; Machado Reyes, L.; Hamilton Cordiés, M. 1998. Principios generales de la terapéutica antimicrobiana. *Acta Médica*. 8 (1): 13-27.

Cullor, J. 1992. Test for identifying antibiotic residues in milk: how well do they work. *Vet. Med.* 87: 1235-1241.

Cullor, J.; Van Eenennaam, A.; Smith, W.; Dellinger, J.; Perani, L.; Jensen, L. 1992. Antibiotic residue assays: can they be used to test milk from individual cows. *Vet. Med.* 87: 477-485.

Cullor, J.; Van Eenennaam, A.; Gradner, Y.; Perani, L.; Dellinger, J.; Smith, W.; Thompson, T.; Payne, M.; Jensen, L.; Guterbock, W. 1994. Performance of various test

used to screen antibiotic residues in milk samples from individual animals. *J. AOAC Int.* 77: 862-870.

Dana, E.; King, M. D.; Malone, R.; Lilley, S. 2000. *New Classification and Update on the Quinolone Antibiotics: Review* - East Carolina University School of Medicine, Greenville, North Carolina, USA..

Davies, J. E. 1980. Aminoglycosides-aminocyclitol antibiotics and their modifying enzymes. En: Lorian V, Ed. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. Editorial Williams & Wilkins, Baltimore, USA, pp.: 474-489.

Davis, B.. 1987. Mechanism of bactericidal action of aminoglycosides. *Microbiol.Rev.* 51: 341-350.

Davis, B.; Chen, L.; Tai, P. 1986. Misread Protein Creates Membrane Channels: an Essential Step in the Bactericidal Action of Aminoglycosides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 6164-6168.

Debackere, M. 1995. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antimicrobial in relation to their residues in milk. *Proceeding Symposium Residues of Antimicrobial Drugs and other inhibitors in milk*. Kiel. August.28-31.

Demoly, P.; Romano, A. 2005. Update on Beta-lactam allergy diagnosis. *Curr.Allergy Asthma Rep.* 1: 9-14.

Devriese, L. A. 1980. Two new types of resistance to lincomycin in pathogenic staphylococci from animals. *Ann. Inst. Pasteur (Paris) France*, 131B: 261-266.

Dhawan, V. K.; Thadepalli, H. 1982. Clindamycin: a review of fifteen years of experience. *Rev. Infect. Dis.* 4: 1133-1153.

Diserens, J.; Beck Henzelin, A.; Le Breton, M.; Savoy Perroud, M. 2005. *Antibiotics in milk: Actual situation & compilation of commercial available screening methods for the detection of inhibitors/antibiotics residues in milk*. Informe técnico: Quality & Safety Department, Nestlé Research Center. Lausanne, Switzerland. pp. 186.

- Dixon Holland, D. E.; Katz, S. E. 1991. Competitive direct enzymelinked immunosorbent screening assay for the detection of sulfamethazine contamination of animal feeds. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 74: 784-789.
- Doan, F.J. 1956. Antibiotics in Milk from Farms. Journal of Dairy Science. 1766-1767.
- Dutta, G. N.; Devriese, L. A. 1981. Degradation of macrolide-lincosamide-streptogramin antibiotics by Lactobacillus strains from animals. Ann. Inst. Pasteur .Paris. 132A: 51-57
- Edder, P.; Coppex, L.; Cominoli, A.; Corvi, C. 2002. Analysis of erythromycin and oleandomycin residues in food by high-performance liquid chromatography with fluorometric detection- Food Additives and Contaminants- ISSN 0265-203X.
- Edson, R.; Terrel, C. 1999. The Aminoglycosides. Clinic. Proc. 74: 519-528.
- Eliopoulos, G.; Moellering, R. 1996. Antimicrobial Combinations. En: Lorian V, editor. Antibiotics in Laboratory Medicine, 4th ed. Baltimore. Williams & Wilkins. 330-383.
- Epstein, M.; Amodio-Groton, M.; Sadick, N. 1997. Antimicrobial Agents for the Dermatologist. II. Macrolides, Fluroquinolones, Rifamicycins, Tetracyclines, Trimethoprim-Sulfamethoxazole, and Clindamycin. J. Am. Acad. Dermatol. 37: 365-381.
- Fedesa. 1999. Una perspectiva sobre antibióticos, salud animal y el debate sobre la resistencia Antibióticos para Animales, disponible en: <http://www.veterindustria.com/modules/interes/files/dossier1.pdf> . 21 de diciembre de 2010. pp.: 21.
- Fernandes, P. B.; Chu, D. T. W. 1988. [Design, synthesis, and properties of \(4S\)-7-\(4-amino-2-substituted-pyrrolidin-1-yl\) quinolone-3-carboxylic acids](#). Annu. Rep. Med. Chem. 23: 133-138.
- Fitton, A. 1992. The quinolones. An overview of their pharmacology. Clin. Pharmacokinet. 22 (1): 1-11.
- FDA (Food and Drug Administration). 1996. Evaluation and Use of Milk Antimicrobial Drug Screening Tests. CVM/FDA. Office of Science. Rockville, M.D. USA.

FDA (Food and Drug Administration). 2003. Guidance for industry: Analytical testing of drugs substances and drug products (Revision 2). The United States Food and Drug administration. Rockville, MD, USA.

Franco, D.A.; Webb, J.; Taylor, C.E. 1990. Antibiotic and sulphonamide residues in meat: Implication for human health. *J. Food Prot.* 53: 178–185.

Frank, S. 1995. Bestimmung der Nachweisgrenzen ausgewählter Antibiotika und Sulfonamide im Brillantschwarz-Reduktionstest. Diss. Universität Diplomarbeit Thier. Triesdorf, Germany. pp.70.

Fuselier, R.; Cadieu, N.; Maris, P. 1999. Results of a proficiency testing for the analysis of carbadox and olaquinox residues in pig tissue. A.F.S.S.A. Community Reference Laboratory for Residues of Veterinary Drugs BP 90203 - 35302 FOUGERES Cedex – Francia.

Gale, E. F.; Cundliffe, E.; Reynolds, P. E.; Richmond, M. H.; Waring, M. J. 1981. *The Molecular Basis of Antibiotic Action*. Ed. John Wiley and Sons. Academic Press. New York. USA. p 478-480.

Gardner, I. A.; Hird, W. W.; Utterback, C. Danaye-Elmi, B. R.; Heron, K. H.; Christiansen, K. H.; Sischo, W. M. 1990. Mortality, morbidity, case-fatality, and culling rates for California dairy cattle as evaluated by National Animal Health Monitoring System. *Prev. Vet. Med.* 8: 157.

Gardner, I.; Cullor, J.; Galey, F.; Sischo, W.; Salman M.; Slanning, H.; Tyler, J. 1996. Alternatives for validation of diagnostic assays used to detect antibiotic residues in milk. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 209: 46-52.

Garey, K. W.; Amsden, G. W. 1999. Trovafloxacin: an overview. *Pharmacotherapy*. 19: 21-34.

Gau, W.; Plaschke, H. J.; Schmidt, K.; Weber, B. J. 1985. Determination of ciprofloxacin in biological fluids by high performance liquid chromatography. *Liquid Chromatogr.* 8: 485.

- Gaudin, V.; Fontaine, J.; Maris, P. 2001. Screening of penicillin residues in milk by a surface plasmon resonance-based biosensor assay: comparison of chemical and enzymatic sample pre-treatment. *Analytica Chimica Acta*, 436:191-198.
- Gilbert, D.N. 2000. Aminoglycosides. En: Mandell, G.L.; Bennett, J.E.; Dolin, R. Editors: Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone. 307-336.
- Giménez Domenech, R.; Vidal Verdú, E.; Natera Kindelán, C. 2002. Empleo Clínico de Antibióticos. Sección de Enfermedades Infecciosas. Hospital Universitario Reina Sofía. Córdoba. *Medicine*. 8(62): 3320-3324.
- Giner Almaraz, S.; Canós Cabedo, M.; Rodilla Calvelo, F.; Ferrer Gómez, C. 1995. Nuevos macrólidos ¿Superan a la Eritromicina? *Farm. Hosp.* 19 (5): 59-265.
- González-Piñera, J.; Barreto Penié, J.; Rodríguez Rodríguez, M. A.; Pino Alfonso, P.P.; Lim Alonso, N. 1998. Macrólidos. *Acta Médica*. 8 (1): 71-74.
- Goodman, L.; Gilman, A. 1990. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 8 ed. Pergamon. New York. USA. p: 1197-1202.
- Greenwood, D. 2003. Sulphonamides. En: Finch, R.; Greenwood, D.; Norrby, S.; Whitley, R. Eds. *Antibiotic and Chemotherapy*. 8th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone. 385-392.
- Gyrd-Hansen, N.; Rasmussen, F.; Smith, M. 1981. Cardiovascular effects of intravenous administration of tetracycline in cattle. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 4 (1): 15-25.
- Haagsma, N., Pluijmakers, H. G., Aerts, M. M., Beek, W. M. 1987. Rapid sample preparation methods for analysis of residues of sulfamethazine and its N4-acetyl and desamino metabolites in swine tissue by HPLC. *Biomed. Chromatogr.* 2: 41-45.
- Hardman, L. E.; Limbird, P. B.; Molinoff, R. W.; Ruddon, R.; Goodman Gilman, A. 2001. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. McGraw-Hill. New York. USA. 103-1021.

Hays, V. W. 1986. Benefits and risks of antibiotics use in agriculture. En: Agricultural uses of antibiotics. Series 320, American Chemical Society Symposium, W. A. Moats, ed. American Chemical Society. Washington, DC., USA. 74-78.

Heeschen, W. 1993. Residues of antibiotics and sulfonamides in milk. En: Inhibitory substances in milk-current analytical practice. IDF Bull. N° 283. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica. 3-12

Heeschen, W.; Blüthgen, A. 1995. Veterinary drugs and pharmacologically active compounds. En: Residues and contaminants in milk products. IDF S. I. N° 9101. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica. 16-39.

Heeschen, W.; Suhren, G. 1995. IDF integrated detection system for antimicrobials: Introductory statement and practical experiences in Germany. En: Residues of Antimicrobial Drugs and Other inhibitors in Milk. IDF S. I. N° 9505. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica. 310-318.

Holtzapfel, C. K.; Buckley S. A.; Stanker L. H. 1997. Development of antibodies against the fluoroquinolone sarafloxacin and molecular modeling studies of cross-reactive compounds Food Agric. Immunol. 9: 13-26.

Honkanen-Buzalski, T.; Reybroeck, W. 1995. Antimicrobials. En: Residues and contaminants in milk and milk products. IDF S.I. n° 9701. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica. p: 26-34.

Horie, M. 1995. Chemical analysis of macrolide antibiotics. Chemical Analysis for Antibiotics Used in Agriculture. AOAC International. Arlington. USA. p. 165-205.

Hozová, B.; Greifová, M. 1995. Comparison of disk assay, Intest and Delvotest P sensitivity for antibiotic residues in milk. Proceedings of the IDF-Symposium in Kiel, Alemania, agosto 28-31, Bruselas, Belgica, pp. 243.

Hunter, G. J. E. 1949. The Effect of Penicillin in Milk on the Manufacture of Cheddar Cheese. J. Dairy Research. 15: 235.

Huovinen, P. 2001. Resistance to Trimethoprim-Sulfamethoxazole. *Clin. Infect. Dis.* 32: 1608-1614.

IDF-FIL (International Dairy Federation).1997. Guidance for the standardized description of microbial inhibitor test. IDF Grup E-503. Antibiotics, Appendix 3: 1-16.

IDF-FIL (International Dairy Federation).2002. Guidance for the standardized description of microbial inhibitor test".IDF-FIL.International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica. Bull N° 183.

International Standarization Organization. 2006. Milk and milk products - Determination of antimicrobial residues - Tube diffusion test. Reference numbers ISO/TS 26844:2006 (E) - IDF/RM 215:2006(E). Genève,Switzerland. pp 13.

INTI-UNL. 2010. Instituto Nacional de Tecnología Industrial – Universidad Nacional del Litoral. Informe: Estudio De Validación 01/2010: Estudio de Validación del Método ResScreen® “BT” y “BS”. Informe Técnico, Junio 2010. pp 8.

Jalava, J.; Kataja, J.; Seppala, H.; Huovinen,P. 2001. In Vitro Activities of the Novel Ketolide Telithromycin (HMR 3647) against Erythromycin-Resistant Streptococcus Species- Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 45 (3) p:789-793.

Jaskch, P. 1988. Der penzym test eine enzymatische schnellmethode zum nachweis von beta-lactam-antibiotika in Rohmilch. Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, Universität München. 29: 898-903

Jester, W. R., Wright,W. W.; and Welch, H. 1959. Antibiotics in fluid milk: fourth nationwide survey. *Antibiot. Chemother.* 9: 393.

Jewetz, E. 1989. Quimioterapia Antimicrobiana. En: Manual de microbiología médica. 9ed. Editorial El Manual Moderno, México, DF, México. 110-153.

Jones G.; Seymour E. 1988. Cowside antibiotic residue testing.*Journal Dairy Science.* 71: 1691-1699.

- Jones, G. M. 1999. On farm test for drug residues in milk, Virginia cooperative extension, Knowledge for the common wealth, Virginia Polytechnic and State University, U.S.A.
- Joshi, N.; Miller, D. 1997. Doxycycline revisited. *Arch. Intern. Med.* 157: 1421-1428.
- Just, P. M. 1993. Overview of the fluoroquinolone antibiotics. *Pharmacotherapy.* 13: 4S-17S.
- Khan, S. A., Nawaz, M. S.; Khan, A. A.; Steele, R. S. and Cerniglia, C. E. 2000. Characterization of erythromycin-resistant methylase genes from multiple antibiotic resistant *Staphylococcus* spp. Isolated from milk samples of lactating cows. *Am. J. Vet. Res.* 61: 1128–1132
- Kapusnik-Uner, J. E.; Sande, M. A.; Chambers, H. F. 1996. Fármacos antimicrobianos: Tetraciclinas, cloranfenicol, eritromicina y diversos antibacterianos. En: Hardman, J. G.; Limbird, L. E.; Molinoff, P. B.; Ruddon, R. W. *Las bases farmacológicas de la terapéutica.* Vol II. 9ª Ed. Goodman Gilman, A. Eds. Editorial McGraw-Hill Interamericana, México. p. 1205-1211.
- Kelly, W. N. 1982. Qualitative ampule and multitest for beta-lactam residues in fluid milk products: collaborative study. *J. AOAC.* 65: 1193-1207.
- Khaskheli, M.; Malik, R.; Arain, M.; Soomro, A. y Arain, A. 2008. Detection of β - Lactam Antibiotic Residues in Market Milk. *Pakistan Journal of Nutrition* 7 (5): 682-685.
- Kim, D. S.; Park, M. S. 1998. Antibiotic use at a pediatric age. *Yonsei Medical Journal* 39: 595–603.
- Kirst, H.; Sides, G. 1983. New directions for macrolide antibiotics: pharmacokinetics and clinical efficacy. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 33: 1419-22.
- Klein, N.; Cunha, B. 1995. Tetracyclines. *Med Clin North Am.* 79: 789-801.
- Kotra, L.; Haddad, J.; Mobashery, S. 2000. Aminoglycosides: Perspectives on Mechanism of Action and Resistance and Strategies to Counter Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 3249-3256.

- Kunin C. M.; Finland M. 1961. Clinical pharmacology of the tetracycline antibiotics. *Clin Pharmacol Ther.* 2:51-56.
- Lacroix, D. 1995. Le dépistage des antibiotiques à la ferme le producteur de lait québécois. *Le Producteur de lait Québécois.* 30–31.
- Lamp, K. C.; Bailey, E. M.; Rybak, M. J. 1992. Ofloxacin clinical pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet.* 22: 32–46.
- Lara, F.; García-Campaña, A.; Alés-Barrero, F.; Bosque-Sendra, M.; García-Ayuso, L..2006. Multiresidue Method for the Determination of Quinolone Antibiotics in Bovine Raw Milk by Capillary Electrophoresis-Tandem Mass Spectrometry- *Anal. Chem.* 78, 7665-7673.
- Leclercq, R.; Carlier, C.; Duval, J.; Courvalin, P. 1985. Plasmid-mediated resistance to lincomycin by inactivation in *Staphylococcus haemolyticus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 28: 421–424.
- Letavic, M. A.; Bronk, B.S.; Bertsohe, C. D. 2002. Synthesis and activity of a novel class of tribasic macrocyclic antibiotics: the triamilides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12: 2771-2774.
- Linage, B.; Gonzalo, C.; Carriedo, J.; Asensio, J.; Blanco, M.; De la Fuente, L.; San Primitivo, F. 2007. Performance of Blue-Yellow Screening test for antimicrobial detection in ovine Milk. *J. Dairy Sci.* 90: 5374-5379.
- Littlefield, N. A.; Sheldon, W. G.; Allen, R.; Gaylor, D. W. 1990. Chronic toxicity/carcinogenicity studies of sulphamethazine in Fischer 344/N rats: two-generation exposure. *Food Chem. Toxicol.* 28: 157-167.
- Liu, M.; Douthwaite, S. 2002. Activity of the ketolide telithromycin is refractory to erm monomethylation of bacterial rRNA. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 1629-33.
- Long, A. R.; Hsieh, L. C.; Malbrough, M. S.; Short, C. R.; Barker, S. A. 1990. Multiresidue method for the determination of sulphonamides in pork tissue. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 38: 423–426.

- Lucas, M. F.; Mestorino, M.; Errecalde, J. O. 2007. Macrólidos: novedades de un clásico grupo de antimicrobianos. *Analecta Veterinaria*. 27(1): 36-45.
- Luitz, M.; Suhren, G. 1995a. Advantages of photometric evaluation of microbial inhibitor test. En: *Residues of Antimicrobial Drugs and Other Inhibitors in Milk*. IDF S. I. N° 9505. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica. 177-181.
- Luitz, M.; Suhren, G. 1995b. Evaluation of microbial inhibitor test with indicator in microtitre plates by photometric measurements. *Milchwissenschaft*, 50: 465-470.
- Luitz, M.; Suhren, G.; Heeschen, W. 1995. Interactions of antimicrobials in milk - consequences for the detection with Delvotest SP special. *Proceedings of the IDF-Symposium in Kiel, Alemania, agosto 28-31*. Bruselas, Bélgica.
- Luitz, M.; Suhren, G.; Hesschen, W. 1996. Interactions of antimicrobials in milk - Consequences for the detection by a microbial inhibitor test. *Milchwissenschaft*. 51: 390-392.
- Lyn, R. Y. 1992. A perspective of penicillin allergy. *Arch. Intern. Med.* 152: 930-937.
- Macaulay, D. M.; Packard, V. S. 1981. Evaluation of methods used to detect antibiotic residues in milk. *J. Food Prot.* 44: 696.
- Mackness, G. B. 1952. The action of drugs on intracellular tubercle bacilli. *J. Pathol. Bacteriol.* 64: 429-446.
- Magerlein, B. J.; Birkenmeyer, R. D.; Kagan, F. 1966. *Antimicrob. Agents Chemother.* 727-736.
- Marín, M. y Gudiol, F. 2003. Antibióticos betalactámicos. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 21(1): 42-55.
- Mäyrä-Mäkinen, A. 1993. The Valio T 101. En: *Inhibitory substances in milk - current analytical practice*. Bulletin of the IDF N° 283. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica. 29-31.

- McConnell, S. A. 1999. Review and Comparison of Advanced-Generation Macrolides Clarithromycin and Dirithromycin. *Pharmacotherapy Publications*. 19(4): 404-415.
- McEvoy, J. D. G.; Mayne, C. S.; Higgins, H. C.; Kennedy, D. G. 1999. Transfer of sulphamethazine from contaminated dairy feed to cows' milk. *Veterinary Record* 144: 470–475.
- McEwen, S. A.; Meek, A. H.; Black, W. D. 1991. A dairy farm survey of antibiotic treatment practices, residue control methods and associations with inhibitors in milk. *J. Food Prot.* 54: 454–459
- McGrane, P.; Rowe, M.T.; Anger, S. 1996. Evaluation of Delvotest SP and Charm AIM-96 for the detection a range of antibiotics in milk. *Milchwissenschaft*. 51: 330-332.
- McGuire, J. M.; Bunch, R. L.; Anderson, R. C.; Boaz, H. E.; Flynn, E. H.; Powell, H. N.; Smith J. W. 1952. Ilotycin, a new antibiotic. *Antibiot. Chemother.* 2: 281-283.
- McManus, M. C. 1997. Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *Am. J. Health Syst. Pharm.* 54: 1420–1433.
- Meek, A. H.; Martin, S. W.; Stone, J. B.; McMillan, I.; Britney, J. B.; Grieve D. G. 1986. The relationship among current management systems, production, disease and drug usage on Ontario dairy farms. *Can. Journal Vet. Res.* 50: 7-10.
- Mella, M. S.; Sepúlveda, A.; González, G.; Helia Bello, T.; Domínguez, M.; Zemelman, R.; Ramírez, C. 2004. Aminoglucósidos-aminociclitolos: Características estructurales y nuevos aspectos sobre su resistencia. *Rev. Chil. Infect.* 21 (4): 330-338.
- Merck & Co. 2000. *El Manual Merck de Veterinaria*. 5ª ed. Ed. Océano. Barcelona.
- Mestorino, O. N.; Errecalde, J. O. 2004. Tilmicosina: un nuevo antibiótico macrólido de uso veterinario. *Analecta Veterinaria*, 24 (2): 21-28.
- Mingeot-Leclercq, M. P.; Glupczynski, Y.; Tulkens, P.M. 1999. Aminoglycosides: Activity and resistance. *Antimicrob Agents Chemother*; 43: 727-737.

- Mitchell, J. M.; Griffiths, M. W.; McEwen, S. A.; McNab, W. B.; Yee, A. J. 1998. Antimicrobial drug residues in milk and meat: causes, concerns, prevalence, regulations, tests, and test performance. *Journal Food Prot.* 61: 742–756.
- Moats, W. A., Anderson, K. L., Rushing, J. R., Buckley, S. 2000. Conversion of Cephapirin to Deacetylcephapirin in Milk and Tissues of Treated Animals. *Journal Agricultural of. Food Chemistry* 48: 498-502.
- Molina, M.P., Althaus, R.L., Zorraquino, M.A., Donate, M.I., Fernandez, N., Peris, C. 1998. Estudio de los métodos de detección de inhibidores en la leche de oveja. *Producción Ovina y Caprina (SEOC), España, XXIII*: 163-166.
- Molina, M.; Segura, C.; Lujan, A.; Diaz, A.; Althaus, R.; Peris, C. 1999. Influencia del calentamiento y del tiempo de incubación sobre la respuesta del método BRT en la leche de cabra. *Industrias Lácteas Españolas.* 241: 37-41.
- Molina, M.; Althaus, R.; Balasch, S.; Torres, A.; Peris, C.; Fernandez, N. 2003. Evaluation of screening test for detection of antimicrobial residues in ewe milk. *J. Dairy Sci.* 86: 1947-1952.
- Montanaro, A. 1998. Sulphonamide allergy. *Immunology and Allergy Clinics of North America* 18: 843.
- Montero, A.; Althaus, R.; Molina, A.; Berruga, I.; Molina, M. 2005. Detection of antimicrobial agents by specific microbiological method Eclipse 100ov for ewe milk. *Small Rum. Res.* 57: 229-237.
- Morejón, M.; Salud, R.; Cué, M. 2003. Actualización en Tetraciclinas. *Rev. Cub. Farm.* 37(3): 1-1.
- Mulazimoglu, L.; Tulkens, P. M.; Van Bambeke, F. 2005. Macrolides. In: Yu, V. L.; Edwards, G.; McKinnon, P. S.; Peloquin C.; Morse G. D. Eds. *Antimicrobial Therapy and Vaccines. Volume II: Antimicrobial Agents.* 2da Edición. ESun Technologies. Pittsburg. USA. p. 243-280.

Müller, F.; Jones, J. 1993. BR-Test and BRT-AS Methods. 24-28. En: Inhibitory substances in milk -current analytical practice. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica. IDF Bull. N° 283.

Nagel, O. G. 2009. Diseño de un sistema microbiológico en microplacas ELISA (SMmp) para la detección e identificación de residuos de antimicrobianos en la leche. Ph.D. Diss. Universidad Nacional del Litoral, Argentina. pp: 271.

Nagel, O.; Zapata, M.L.; Basílico, J.C.; Molina, P. and Althaus, R. (2009a). Effect of Chloramphenicol on a Bioassay Response for the Detection of Tetracycline Residues in Milk. *Journal of Food Drug Analysis*. 7: 36-42.

Nagel, O. G.; Molina, M. P.; Basílico, J. C.; Zapata, M. L; Althaus, R. L. 2009b. Robust experimental design for optimizing the microbial inhibitor test for penicillin detection in milk. *Letters in Applied Microbiology*. 48: 744-749.

Nagel, O. G.; Zapata, M. L.; Basílico, J. C.; Molina, M. P; Althaus, R. L. 2009c. Estudio del sinergismo entre sulfamidas en leche y trimetoprim en un bioensayo que utiliza *Geobacillus stearothermophilus*. *Revista FAVE, Sección Ciencias Veterinarias*. Editorial de la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral. 8(1): 16-27.

Nagel, O.; Molina, P.; Althaus, R. 2010. Optimization of bioassay for tetracycline detection in milk by means of chemometric techniques. *Letters in Applied Microbiology*. En prensa.

Neu, H. 1987. Conceptos Generales sobre Quimioterapia de Enfermedades Infecciosas. *Clin. Med. North America*. 71: 1115.

Nielsen, P. 1979. The Metabolism of Four Sulphonamides in Cows. *Biochem. J*. 136: 1039-1045.

Norrby, S. R.; Lietman, P. S. 1993. Safety and tolerability of fluoroquinolones. *Drugs*. 45(3): 59-64.

- Nouws, J.; Van Egmond, H.; Shulders, I.; Loeffen, G.; Schouten, J.; Stegeman, H. 1999a. A microbiological assay system for assessment of raw milk exceeding EU maximum residue level. *Int. Dairy Journal*. 9: 85-90.
- Nouws, J.; Van Egmond, H.; Loeffen, G.; Schouten, J.; Keukens, H.; Smulders, I.; Stegeman, H. 1999b. Suitability of the charm hvs and a microbiological multiplate system for detection of residues in raw milk at eu maximum residue levels. *The Veterinary Quarterly*. 21: 21-27.
- Packham, W.; Broome, M. C.; Limsowtin, G. K. Y.; Roginski, H. 2001. Limitations of standard antibiotic screening assays when applied to milk for cheesemaking. *Australian Journal Dairy Tech*. 56: 15-18.
- Palomino, J.; Pachón, J. 2003. Aminoglucósidos. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 21(2): 105-115.
- Pancoast, S. J. 1988. Aminoglycoside antibiotics in clinical use. *Med. Clin. North America*. 72: 581-612.
- Panjarathinam, R. N. 1974 in *A Text Book of Homoemopathic pharmacy*. Ed. Mandal & Mandal. First Publication. New Delhi, India, 414 pp.
- Pastor-Navarro, N.; Garcia-Rover, C.; Maquieira, A.; Puchades, R. 2004. Specific polyclonal-based immunoassays for sulphathiazole. *Annals of Bioanalytical Chemistry* 379: 1088–1099.
- Payne, M.; Bruhn, C. M.; Reed, B.; Scarce, A.; O'Donnell, J. 1999. On-farm quality assurance programs: a survey of producer and industry leader opinions. *J. Dairy Sci.* 82: 2224–2230.
- Pelczar, M. 1986. *Microbiology*, 5ed. Mc Graw Hill Book Company. New York, U.S.A. 510-511.

- Pérez Trallero, E.; Iglesias, L. 2003. Tetraciclinas, sulfamidas, metronidazol. Servicio de Microbiología. Hospital Donostia. San Sebastián. España. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*; 21(9): 520-529.
- Periti, P. 1995. Brodimoprim, a New Bacterial Dehydrofolate Reductase Inhibitor: a minireview. *Journal Chemother.* 7(3): 221-223.
- Perreten, V.; Teuber, M. 1995. Antibiotic resistance bacteria in fermented dairy products a new challenge for raw milk cheese. En: *Residues of antimicrobial drugs and other inhibitors in milk*. IDF S.I. 9505. Kiel, Germany. p: 144-148.
- Phillips, I.; Shannon, K. P. 1997. Aminoglycosides and aminocyclitols. En: O'Grady, F.; Lambert, H. P.; Finch, R. G.; Greenwood, D. *Antibiotic and Chemotherapy*. 7ma Ed. Churchill Livingstone, New York, USA. p: 363-368.
- Pikkemaat, M.; Rapallini, M.; Ostra-van Dijk, S.; Elferinka, J. 2009. Comparison of three microbial screening methods for antibiotics using routine monitoring samples. *Anal. Chim. Acta.* 637: 298-304.
- Prescott, J. F. 2002. Lincosamidas, macrólidos y pleuromutilinas. En: Prescott, J.F.; Baggot, J. D.; Walter, R. D. Editores. *Terapéutica Antimicrobiana en Medicina Veterinaria*. Ed. Intermédica. 3ª Ed. Argentina. p: 204-232
- Prescott, J.; Baggott, J.; Walker, R. 2002. *Terapéutica Antimicrobiana en Medicina Veterinaria*. Ed. Inter-Médica. Iowa, USA
- Reichmuth, J.; Shuren, G.; Beukers, R. 1997. Evaluation of microbial inhibitor test- the IDF approach. *Milchwissenschaft.* 52: 691-695.
- Renard, L. 1994. Modelisation de la relation pharmacocinetique-pharmacodynamie en antibiotherapie veterinaire (these pour le diplôme d Docteur de L'Universite de Limonges, specialite: Sciences pharmaceutiques). Faculte de Pharmacie, Universidad de Limonges. France.

Reybroek, W. 1994. Evaluation of screening test for the detection of antimicrobial residues in milk. Proceedings of the IDF Symposium in Kiel, Alemania, agosto 28-31, Bruselas, Bélgica.

Reybroek, W. 1995a. Field test of screening test for the detection of antimicrobial residues in milk. En: Residues of Antimicrobial Drugs and Other Inhibitors in Milk. IDF S. I. N° 9505. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica. 218-218.

Reybroek, W. 1995b. Sensitivity and selectivity of screening tests for the detection of antimicrobial residues in milk. Proceedings of the IDF Symposium in Kiel, Alemania, agosto 28-31, Bruselas, Bélgica.

Reynolds, J. 1995. Ed. Martindale. The Extra Pharmacopoeia, 30th ed. The Pharmaceutical Press. London. p: 79-113.

Riediker, S., Diserens, J. M., Stadler, R. H. 2001. Analysis of β -Lactam Antibiotics in Incurred Raw Milk by Rapid Test Methods and Liquid Chromatography Coupled with Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. Journal Agricultural of. Food Chemistry. 49: 4171-4176.

Roca, M.; Borrás, M.; Molina, M. 2007. Evaluación de la validez de la determinación-semicuantificación de antibióticos en la leche cruda de vaca por los métodos comercializados en España. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid, España. pp. 106.

Rubio, M.; Boggio, J. C.. 2009. Farmacología Veterinaria, 2ed. Córdoba, Argentina. EDUCC.

Ruegg, P. L. 2003. Practical Food Safety Interventions for Dairy Production. Journal Dairy Sci. American Dairy Science Association. 86(E): E1-E9.

Ruiz, V.; Moreno, G. 2005. Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Ed. médica panamericana. Madrid. p: 209-210.

- Sádaba, B.; Azanza, J. R. 2005. Antibióticos macrólidos y otros antibióticos. En: Leza Cerro, J.C.; Lizasoain Hernández, I.; Lorenzo Fernández, P.; Moreno González, A.; MoroSánchez, M. A. (eds): Velásquez. Farmacología básica y clínica (20ª Ed) Buenos Aires, Ed. Panamericana, p. 825-839.
- Salter, R., Douglas, D., Tess, M., Markovsky, B., Saul, S. 2006. Interlaboratory Study of the Charm ROSA Safe Level Aflatoxin M1 Quantitative Lateral Flow Test for Raw Bovine Milk. *Journal of AOAC International*. 89 (5): 1327-1334.
- SAS® Institute Inc. 2001. SAS Users guide: statistics version 9.1. Cary, NC.
- Saschenbrecker, P. W.; Fish, N. A. 1980. Sulphamethazine residues in uncooked edible tissues of pork following recommended oral administration and withdrawal. *Canadian Journal of Comparative Medicine*. 44: 338-345.
- Sawant, A. A.; Sordillo, L. M.; Jayarao, B. M. 2005. A Survey on Antibiotic Usage in Dairy Herds in Pennsylvania. *J. Dairy Sci*. 88: 2991-2999.
- Scannella, D.; Neaves, P.; Keedy, K.; Bell, C. 1997. An evaluation of the delvo x-press β L test for detecting β -lactams in Ex-farm raw Milks. *Dairy Journal*. 7: 93-96.
- Schiffmann, A.P.; Schütz, M.; Wiesner, H. 1992. False negative and positive results in testing for inhibitory substances in milk. Factors influencing the brilliant black reduction test (BRT). *Milchwissenschaft*. 47 (12): 770-772.
- Schliephake, A. 1996. Optische Dichtemessung des Wachstums Ausgewählter Bakterienstämme unter Hemmstoffeinfluß. Tesis Doctoral Escuela Superior de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Hannover, Alemania. 181p.
- Schlossberg, D. 1995. Azithromycin and Clarithromycin. *Med Clin N Am*; 79: 803-815.
- Schneider, M. J.; Lehotay, S. J. 2006. Rapid Fluorescence Screening Assay for Tetracyclines in Chicken Muscle. *Journal of AOAC International*, 87 (3): 587- 591.

Schneider, M. J.; Lehotay, S. J. 2008. A comparison of the FAST[®], Premi[®] and KIS[™] tests for screening antibiotic residues in beef kidney juice and serum. *Anal. Bioanal. Chem.* 390: 1775–1779.

Schneider, M. J.; Mastovska, K.; Lehotay, S. J.; Lightfield, A. R.; Kinsella, B.; Shultz, C.A. 2009. Comparison of screening methods for antibiotics in beef kidney juice and serum. *Analytica Chimica Acta.* 637: 290–297.

Schwarz, S.; Chaslus-Dancla, E. 2001. Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Veterinary Research.* 32: 201–225.

Schumacher, W.E. 1968. American Cyanamid Company Report FD 16: 352-378. Experiment A-67-36-FT.

SENASA (Servicio de Sanidad y Calidad Agroalimentaria). 1999. Decreto 815/1999. 24 de julio 1999. pp. 14.

SENASA (Servicio de Sanidad y Calidad Agroalimentaria). 1999, 2000. Normativa UE Tambos UE4, UE5, UE6. Parte de Supervisión. p: 10-21.

SENASA (Servicio de Sanidad y Calidad Agroalimentaria). 2001. Dirección de Agroquímicos y Productos Farmacológicos y veterinarios. Coordinación Gral. de Productos Farmacológicos Veterinarios y Alimentos para Animales. Prohibiciones y Restricciones en la utilización de drogas en medicina veterinaria. Disponible en: <http://www.senasa.gov.ar/agro/prohibiciones>.

SENASA (Servicio de Sanidad y Calidad Agroalimentaria). 2003. Dirección de Agroquímicos, Productos Farmacológicos y veterinarios. Decreto 256/2003. Disponible en <http://www.senasa.gov.ar/contenido.php?to=n&in=1033&io=4379>.

Senyk, G.; Davisodson, J.; Brown, J.; Hallstead, E.; Sherbon J. 1990. Comparasion of rapid test used to detect antibiotic in milk. *J. Food Prot.* 53: 158-164.

Seymour, E. H.; Jones, G. M.; and McGilliard, M. L. 1988a. Persistence of Residues in Milk Following Antibiotic Treatment of Dairy Cattle. *J. Dairy Sci.* 71: 2292-2296.

- Seymour, E. H.; Jones, G. M.; McGilliard, M. L. 1988b. "Comparisons of on-farm screening test for detection of antibiotics residues". *J. Dairy Sci.* 71: 539-544.
- Shryock, T. R.; Mortensen, J. E.; Baumholtz, M. 1998. The effects of macrolides on the expression of bactericidal virulence mechanisms. *J. Antimicrob. Chemother.* 41: 505-512
- Sischo, W.; Burns, C. 1993. Field trial of four cow-side antibiotic residue screening test. *J.A.V.M.A.* 202: 1249-1254.
- Sischo, W. 1996. The issue of testing quality. Symposium drug residue avoidance. *Journal Dairy Sci.* 79: 1065-1073.
- Skold, O. 2000. Sulfonamide Resistance: Mechanisms and Trends. *Drug Resist Updat*; 3: 155-160.
- Smilack, J. 1999. The Tetracyclines. *Clin. Proc.* 74: 727-729.
- Smink, D. 1979. A standard test for the detection of antibiotic residues in milk". *North European Dairy Journal.* 3: 7-8.
- Smith, J. T.; Lewin C. S. 1988. The Quinolones. Editor V. T. Andriole, Academic Press, London, p: 23-82.
- Sorgel, F.; Jaehde, U.; Naber, K. G.; Stephan, U. 1989. Pharmacokinetic disposition of quinolones in human body fluids and tissues. *Clin. Pharmacokinet.* 16: 51S-68S.
- Stein, G. E. 1996. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of newer fluoroquinolones. *Clin. Infect. Dis.* 23 (1): 19-24.
- Stein, G. E.; Havlichek, D. H. 1998. Newer oral antimicrobials for resistant respiratory tract pathogens. Which show the most promise? *Postgrad Med.* 103(6): 67-70, 74-76.
- Suhren, G.; Heeschen, W. 1994. Proficiency study of microbial inhibitor test. *Milchwissenschaft.* 49: 629-633.
- Suhren, G. 1995. Possibilities and limitations of microbiological inhibitor test. En: *Residues of Antimicrobial Drugs and Other Inhibitors in Milk.* IDF S.I. N° 9505. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica. 159-171.

- Suhren, G.; Beukers, R. 1998. Delvotest SP for detection of cloxacillin and Sulfamethoxazole in milk: IDF Interlaboratory Study. *J. AOAC Int.* 81: 978-989.
- Sumano, H. S.; Ocampo, L. 1997. Quimioterapia de las enfermedades microbianas. 118-137. En: *Farmacología Veterinaria*, 2ª ed. Ed. McGraw-Hill Interamericana. Madrid.
- Thomas, S. and Panes, J. J. 1956. Further Studies on the Effects of Penicillin in Milk Used for the Manufacture of Cheshire Cheese. *J. Soc. Dairy Technol.* 9 (2): 87.
- Thompson, B. 1987. Cephalosporin, Carbapenem and Monobactam Antibiotics. *Clin. Proc.* 62: 821-832.
- Toldra, F.; Reig, M. 2006. Methods for rapid detection of chemical and veterinary drug residues in animal foods. *Trends Food Sci. Technol.* 17: 482-489.
- Tramontin, S.; Bonato, P.; Spolaor, D. 1992. Uso di un metodo immunoenzimatico per la ricerca rapida degli antibiotici nel latte. Istituto Lattiero Caseario e di Biotecnologie Agroalimentari. Thiene, Vicenza, Italy.
- Trullols, E. 2006. Validation of Qualitative Analytical Methods. Tesis Doctoral. Universitat Rovira I Virgili, Tarragona. España. pp: 287.
- Tyler, J.; Cullor, J.; Erskine, R.; Smith, W.; Dellinger, J.; Macclure, K. 1992. Milk antimicrobial drug residue assay results in cattle with experimental, endotoxin-induced mastitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 210: 1378-1384.
- Van Os, J.; Beukers R. 1980. A multitest system for detection of antibiotics in milk. *J. Food Prot.* 43: 510-511.
- Van Rhijn, J. A.; Lasaroms, J. J. P.; Berendsen, B. J. A.; Brinkman, U. 2002. Liquid chromatographic-tandem mass spectrometric determination of selected sulphonamides in milk. *Journal of Chromatography A.* 960: 121-133.
- Waksman, S. A. 1946. Present status of streptomycin therapy. *Lancet.* 66: 77-83.
- Wang, J.; Leung, D. 2007. Analyses of macrolide antibiotic residue in eggs, raw milk, and honey using both ultra-performance liquid chromatography/ quadrupole time-of-flight mass

- spectrometry and high-performance liquid chromatography/ tandem mass spectrometry. *Rapid Commun.Mass Spectrom.* 21: 3213-3222.
- Webster, G.1996. Newer Antibiotics: A Dermatologist's Guide. *Advan.Dermatol.* 11: 105-115.
- Welch, H.; Jester, W. R.; Burton, J. M. 1955. Antibiotics in fluid milk.*Antibiot.Chemother.*5: 571.
- Wilke, M. S.; Andrew, L.; Lovering, A. L.; Strynadka, N. C. 2005.β-Lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Current Opinion in Microbiology* 8: 525-533
- Wolfson, J. S.; Hooper, D. C. 1989.Fluoroquinolone antimicrobial agents. *Clín. Microbiol. Rev.* 2: 378-424.
- Wright, A.; Wilkoushe, J. 1987.The Penicillins. *Mayo Clin Proc*; 62: 806-819.
- Wyka, M.; St John, A. 1990.Effects of Production of Abnormal Proteins on the Rate of Killing of *Escherichia coli* by Streptomycin.*Antimicrob Agents Chemother.* 34: 534-538.
- Yamaki. M.; Berruga, M. I.; Althaus, R. L.; Molina, M. P. and Molina, A. 2004. Ocurrence of Antibiotic Residues in Milk from Manchega ewe Dairy farms. *J. Dairy Sci.* 87: 3132-3137.
- Young, L. S. 1994. Tratamiento antimicrobiano. En: Wyngaarden, J.; Lloyd, H. S.; Bennett, J. Eds. *Cecil: tratado de Medicina Interna.* 19 ed. Nueva Editorial Interamericana. México, DF, México. p: 1859-1872.
- Zaadhof, H.; Maltbauer, A.; Vormeiter, A.; Schweizer, L. 1997. Zureignung kommerzieller mikrobiologischer hemmstofftests als suchverfahren auf das vorhandensein von antiinfektiva in milch und erzeugnissen auf milchbasis. *Archiv für Lebensmittelhygiene.* 48: 132-144.
- Zeng, S.; Escobar, E.; Brown-Crowder, Y. 1996. Evaluation of screening test for detection of antibiotics residues in goat milk. *Small Ruminant Res.* 21: 155-160.
- Zeu-Inmunotec. 2003. Screening Plus. Informe técnico.Ed. ZEU-Inmunotec S. L. Zaragoza, España.

Ziv, G.; Rasmussen, F. 1974. Distribution of Labeled Antibiotics in Different Components of Milk Following Intramammary and Intramuscular Administrations. *J. Dairy Sci.* 58(6): 938-946.

Ziv, G.; Sulman, F.G. 1974. Absorption of Antibiotics by the Bovine Udder. *Journal of Dairy Science.* 58(11): 1637-1644.

Zomer, E.; Lieu, T. 1995. AIM-96, a broad spectrum antimicrobial drug inhibition monitoring assay: advantages and enhancement of an integrated monitoring system. In *Residues of antimicrobial drugs and other inhibitors in milk.* IDF S.I. no. 9505 ed. FIL-IDF Secretariat General. pp. 192-194. Brussels, Belgium: International Dairy Federation.

Zorraquino, M. 1996. Aplicación de un sistema de análisis de riesgos y puntos críticos para asegurar una leche libre de residuos de medicamentos veterinarios. Conferencia XIII Reunión de Técnicos especialistas en control de mastitis y calidad de leche. Pamplona, 5 de octubre de 1996.

Zorraquino, M. 1997a. Niveles de residuos de medicamentos veterinarios en leche por debajo de los límites máximos de residuos de la UE. Conferencia XIV Reunión de técnicos especialistas en control de mastitis y calidad de la leche. Mallorca, 30 de octubre de 1997.

Zorraquino, M. 1997b. "Validación BR-Test: efecto azidol y tiempos de incubación". Conferencia XIV Reunión de Técnicos especialistas en control de mastitis y calidad de la leche. Mallorca, España. 30 de octubre de 1997.

Zorraquino, M. 1998. Límites de detección del método BRT en leche de vaca. Conferencia XV Jornadas del Grupo de Técnicos especialistas en Mastitis y Calidad de la Leche. Lugo, España.

Zorraquino, M.A. 2005. Inactivación térmica de sustancias antimicrobianas en leche. Tesis Doctoral. Universidad Pública de Navarra. España.

Zorraquino, M.; Roca, M.; Castillo, M.; Althaus, R.; Molina, M. 2008a. Effect of thermal treatments on the activity of quinolones in milk. *Milchwissenschaft.* 63: 192-195.

Zorraquino, M.; Roca, M.; Fernandez, N.; Molina, M.; Althaus, R. 2008b. Heat inactivation of beta-lactam antibiotics in milk. *J. Food Prot.* 71: 1193-1198.

Zorraquino, M.; Althaus, R.; Roca, M.; Molina, M. 2009. Effect of Industrial Heat Treatments on the Antimicrobial Activity of Aminoglycosides in Milk. *Journal of Food protection.* 72: 1338-1341.

Zwald, A. G.; Ruegg, P. L.; Kaneene, J. B.; Warnick, L. D.; Wells, S. J.; Fossler, C.; Halbert, L. W. 2004. Management Practices and Reported Antimicrobial Usage on Conventional and Organic Dairy Farms. *American Dairy Science Association. J. Dairy Sci.* 87: 191–200.

