

UTILIZACIÓN DE UN MÉTODO DE INHIBICIÓN MICROBIOLÓGICA PARA LA DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE RETIRADA DE AMOXICILINA EN LECHE

CERUTTI, R. D.¹, ALTHAUS, R. L.², BARBERO, F.³,

LITTERIO, N.³ & BOGGIO, J. C.^{1,3}

RESUMEN

La amoxicilina es un antimicrobiano betalactámico utilizado frecuentemente en diversas afecciones de bovinos lecheros, como problemas podales, reproductivos e infecciones mamarias. Por tal motivo es frecuente su presencia en leche proveniente de los animales tratados con este antimicrobiano. Con el objeto de evaluar la influencia de la vía de administración de amoxicilina en el tiempo de retirada de leche utilizando un método microbiológico rápido, se realizó un ensayo con 12 vacas de raza Holando Argentino en producción, que fueron divididas en dos grupos de 6 animales cada uno. A uno se le administró amoxicilina en forma intramamaria y al otro por vía intramuscular; tomándose muestras de leche dos veces por día hasta sexto post-administración. La presencia de residuos en la leche se evaluó mediante una método de inhibición microbiológica (Charm AIM-96), en términos de “positivo” o “negativo”. Para comprobar las diferencias entre ambas vías se realizó un análisis mediante un modelo de regresión logística, obteniéndose diferencias significativas entre ambas vías de administración ($p < 0,0015$) y número de ordeños ($p < 0,0001$). Siendo mayor la persistencia de amoxicilina en leche de los animales tratados en forma intramuscular que intramamaria, con excreciones completas a los 5 y 7 ordeños post-administración, respectivamente.

Palabras clave: amoxicilina, vías de administración, tiempo retirada, bovino de leche, método de screening.

SUMMARY

Amoxicillin is a betalactamic antimicrobial agent frequently used in bovine's affections. The purpose of this work is to evaluate amoxicillin administration routes effect on milk withdrawal time. A trial was carried out on 12 lactating Holstein cows divided in two groups, 6 animals each. One group received amoxicillin via intramuscular route and the other via intramammary route. Milk samples were taken until day 6 after administration. Presence of residues in the milk was evaluated by screening tests (Charm AIM-96), in terms of “positive” or “negative”. A logistic regression analysis was carried out to test the difference between routes, which resulted significant. Persistence of amoxicillin in milk after intramuscular drug administration was higher than after intramammary administration. Drug was present up to 7 and 5 milkings after administration, respectively.

Key words: amoxicillin, withdrawal time, dairy cows, administration routes, screening tests.

1.- Cátedra de Protección, Tecnología e Inspección de leche y derivados. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral. Kreder 2805. (3080) Esperanza, provincia de Santa Fe. Tel: (03496) 420639.

2.- Cátedra de Física Biológica. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral.

3.- Cátedra de Farmacología. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral.

Manuscrito recibido el 29 de mayo de 2001 y aceptado para su publicación el 20 de noviembre de 2002.

INTRODUCCIÓN

La presencia de residuos de productos químicos en alimentos, representa desde hace tiempo, una de las mayores preocupaciones de productores, técnicos, científicos, autoridades y especialmente los consumidores, optando muchos países por imponer sanciones económicas a los establecimientos que suministran leche con residuos de antimicrobianos. Por ello, se fijan límites máximos de residuos (LMR) que hay que respetar especialmente para fijar el tiempo en que la leche no debe ir a la industria luego que un animal ha sido tratado (Woodward, 1998).

Dichas sanciones se han impuesto como medida preventiva para evitar inconvenientes relacionados con la salud pública y problemas que originan la presencia de residuos en los procesos tecnológicos, ya que numerosos antimicrobianos, incluyendo los antibióticos, pueden retrasar e incluso inhibir completamente los procesos bacterianos implicados en la elaboración de algunos productos lácteos, como por ejemplo el queso (Brady *et al.*, 1988; Dewdney *et al.*, 1991; Mourot & Loussourorn, 1981).

La amoxicilina es un antimicrobiano del grupo de los betalactámicos, con mayor espectro de acción y liposolubilidad que la penicilina; que se utiliza en diversas afecciones de bovinos lecheros, como problemas podales, reproductivos e infecciones mamarias, siendo frecuente su presencia en leche proveniente de los animales tratados con este fármaco (Prescott & Baggot, 1994).

En grandes especies existen en el mercado formulaciones para aplicar por vía sistémica o intramamaria, siguiendo un patrón de excreción a través de la ubre diferente según la vía que se utilice, variando las concentraciones alcanzadas y su persistencia produciendo, como consecuencia de ello,

cambios en los tiempos de retirada de leche (Bossiau & Moretain, 1983).

Para su detección se utilizan métodos cuantitativos y cualitativos, siendo los primeros los más apropiados por su exactitud aunque resultan más complejos y costosos. Entre los segundos se utilizan numerosas técnicas microbiológicas simples y económicas que garantizan determinaciones por debajo de los LMR fijados. No obstante al no cuantificar y por basarse en inhibiciones de crecimiento bacteriano resulta muy controvertida su utilización en la fijación de tiempos de retirada (Anderson *et al.* 1996; Reyboeck, 1995).

Por todo lo expuesto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la influencia de la vía de administración de amoxicilina en bovinos lecheros en producción sobre el tiempo de retirada de leche utilizando un método de inhibición microbiológica rápido.

MATERIALES Y MÉTODOS

Condiciones experimentales

En el diseño experimental se utilizó un grupo de 12 animales hembras de la especie bovina de raza Holstein en lactancia, clínicamente sanas. La alimentación en base a alfalfa, se mantuvo constante dos semanas antes de iniciar el experimento y durante el mismo.

Los animales fueron divididos en dos grupos (Grupo I y II) e identificados mediante caravana en la oreja izquierda. A los animales del Grupo I se les administro por vía intramamaria una sola aplicación en cada cuarto de un pomo que contenía 200 mg de amoxicilina sódica, mientras que los animales del Grupo II se los trato por vía intramuscular con una dosis de amoxicilina sódica de 2 mg/kg p.v., en una formulación inyectable al 2 %.

Se tomaron muestras de leche procedente

de los cuatro cuartos de los animales individuales en los dos ordeños diarios y hasta el día sexto postadministración.

Método de determinación de amoxicilina

Para determinar la presencia de amoxicilina se utilizó un método de inhibición microbiológica (Charm® AIM-96), este test utiliza esporas de *Bacillus stearothermophilus* variedad *colidolactis* con un indicador de pH en el medio. Durante la incubación el microorganismo consume glucosa produciendo ácido que baja el pH a menos de 6, un cambio de color a “amarillo-verdoso” indica el crecimiento y la no inhibición, mientras que el color “azul” indica una muestra sospechosa positiva. El test usa un incubador con un paso de fijación final con calor para estabilizar el resultado, esto elimina la necesidad de remover las placas del incubador y leer el resultado inmediatamente. Hay un paso de pasteurización para reducir el efecto del cloro o inhibidores naturales (Block & Meissner, 1995).

Tratamiento estadístico de los datos

Con el propósito de analizar el efecto de la vía de administración (V) y el número de ordeño (O) posteriores a la administración del fármaco sobre la frecuencia de la respuesta del método de inhibición microbiológico Charm® AIM-96 se aplicó el modelo de regresión logística a dos niveles “positivo” y “negativo” (Agresti, 1990).

Los resultados se obtuvieron mediante la opción STEPWISE del procedimiento LOGISTIC contenido en el paquete estadístico SAS®. El diseño estadístico para analizar los

efectos antes mencionados sobre las calificaciones visuales del método de detección utilizado fue el siguiente:

$$L_{ijk} = \text{logit} [P_{ijk}] = \mu + V_i + O_j + \varepsilon_{ijk}$$

donde: L_{ijk} = modelo logístico; $[P_{ijk}]$ = probabilidad de frecuencias “positivas / negativas”; μ = media general; V_i = efecto de la vía de administración, en término de variables dummy ($X=0$: intramamario y $X=1$: intramuscular); O_j = efecto del número de ordeño posteriores al tratamiento, ε_{ijk} = error residual del modelo.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en los diferentes grupos de animales se constata una mayor persistencia de amoxicilina en leche de los animales tratados en forma intramuscular con respecto a la vía intramamaria, siendo de 5 y 7 ordeños post-administración, respectivamente.

En la Fig. 1 se observa las velocidades de eliminación de amoxicilina determinadas mediante el método Charm® AIM-96.

La utilización del modelo de regresión logístico consideró significativo el efecto de las vías de administración utilizadas ($c^2 = 10.0258$, $p < 0.0015$) y el número de ordeño post-tratamiento ($c^2 = 14.5810$, $p < 0.0001$) sobre la repuesta del método Charm® AIM-96.

La expresión matemática que representa las variaciones en las frecuencias de respuestas “positivas / negativas” es:

$$L = \text{Logit} [P] = 13.6769 + 5.2968 \cdot X - 2.6484 \cdot O$$

(Concordancia 98.1 %)

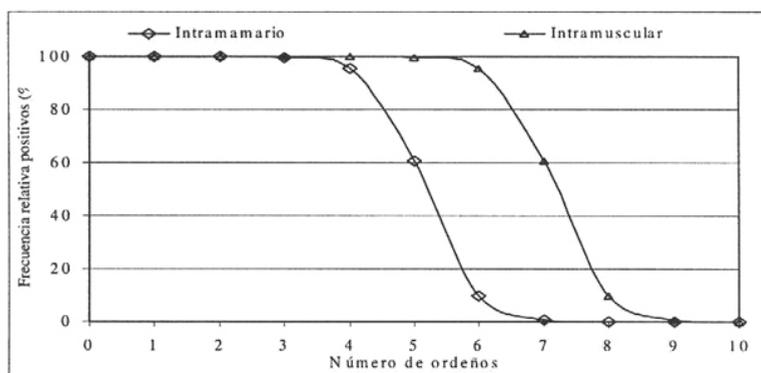


Fig 1. Efecto de la vía de administración de amoxicilina y tiempo post tratamiento sobre la respuesta del método Charm® AIM-96.

donde: "X=0" para tratamiento intramamario, "X=1" para tratamiento intramuscular y "O" número de ordeños.

DISCUSIÓN

La técnica utilizada para la detección de amoxicilina es adecuada, ya que su límite de detección es de 4 ppb y los límites máximos de residuos (LMR) establecidos por los organismos de control son de 4 ppb (SENASA, 1999) y de 10 ppb (CODEX, 1996). No obstante, por tratarse de una técnica cualitativa, los tiempos de retirada recomendados en este trabajo serán seguros para la Salud Pública y los procesos de industrialización.

El tiempo de retirada es similar al citado por otros autores y reconocido por organismos internacionales de 60 horas para la vía intramamaria y 90 horas para la vía intramuscular. (Prescott & Baggot, 1994).

Esta mayor persistencia de droga por vía intramuscular difiere de los valores sugeridos por otros autores que señalan una mayor persistencia de antimicrobianos en la administración intramamaria con respecto a la aplicación sistémica (Brouillet, 1994;

Milhaud, 1985). No obstante debe considerarse el posible efecto de la formulación de la droga y el estado funcional de la ubre (Bossiau & Moretain, 1983).

La amoxicilina se podría estar comportando como otros antibióticos del grupo betalámico, que alcanzan mayores concentraciones en la fase acuosa de la leche que en los lípidos y una limitada unión a proteínas tisulares, lo que explica la mayor velocidad de excreción (Zurich, 1992).

Los resultados del presente estudio demuestran que la técnica de detección utilizada es segura para evaluar el comportamiento de la excreción por vía mamaria de la amoxicilina bajo diferentes vías de administración, estableciendo de esta forma un criterio objetivo para ser utilizado por profesionales veterinarios, técnicos de la industria láctea y productores, con respecto a la permanencia de estos como residuos en leche.

BIBLIOGRAFÍA

AGRESTI, A. 1990. Categorical Data Analysis. Ed. John Wiley & Sons. New York,

558 pp.

- ANDERSON, K., MOATS, W., RUSHING, J., WESEN, D. & PAPICH, M.** 1996. "Ampicillin and amoxicillin residue detection in milk, using microbial receptor assay and liquid chromatography methods, after extra-label administration of the drugs to lactating cows. *American Journal Veterinary Research*. 57 (1) 73 - 78.
- BLOCK, H. & J. MEISSNER.** 1995. The use of CHARM AIM-96 inhibitions test in quality control of raw milk on farm level.. In *Residues of antimicrobial drugs and other inhibitions in milk*. Ed. International Dairy Federation - Brussels, 205-206.
- BOISSEAU, J. & J. MORERAIN.** 1983. Drug excretion by the mammary gland. In *Veterinary Pharmacology and Toxicology*, RUC-KEBUSH, Y.; TOUTAIN, P.; & G. KORITZ. Ed. MTP Press Limited. Boston.
- BRADY, M. S. & S. E. KATZ.** 1988. Antibiotic/antimicrobial residues in milk. *J. Food Prot.* 51: 8-11.
- BROUILLET, P.** 1994. Maitrise de la présence d'inhibiteurs dans le lait. *Rec. Méd. Vét.* 170 (6-7): 443-455.
- CODEX ALIMENTARIUS.** 1996 *Residuos de Medicamentos Veterinarios en los Alimentos*. FAO-OMS, Roma, 230 pp.
- DEWDNEY, J. M., MAES, L., RAYNAUD, J. P., BLANC, F., SCHEID, J. P., JACKSON, T., LENS, S., & C. VERS-CHUEREN.** 1991. Risk assessment of antibiotic residues of beta-lactams and macrolides in food-products with regard to their immunoallergic potential. *Food and Chemical Toxicology*. 29: 477-483.
- MILHAUD, G.** 1985. Traitement des mammites: pharmacokinétique des médicaments utilisés et conséquences. *Rec. Méd. Vét.* 161 (6-7): 579-585.
- MOUROT, D. & S. LOUSSOURORN.** 1981. Sensibilité des ferments lactiques aux antibiotiques utilisés en médecine vétérinaire. *Rec. Med. Vét.* 157: 175-177.
- PRESCOTT, J. F. & BAGGOT, J. D.** 1994. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. Ed. Iowa State University Press, 2^a ed. Iowa. 690.pp.
- REYBOECK, W.** 1995. Evaluation of screening tests for the detection of antimicrobial residues in milk. In *Residues of antimicrobial drugs and other inhibitions in milk*. Ed. International Dairy Federation - Brussels, 182-186.
- SENASA.** 1999. *Plan de Control de Residuos e Higiene de los Alimentos*. 32 pp.
- WOODWARD, K. N.** 1998. The use of microbiological end-points in the safety evaluation and elaboration of maximum residue limits for veterinary drugs intended for use in food producing animals. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 21 (1): 47 - 53.
- ZURICH, L.** 1992. Mastitis bovina: análisis actualizado de la terapia sistémica y sus bases farmacológicas. *Med. Vet.* 14 (1): 11-19.