

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

Maestría en Ciencias Veterinarias
Mención Salud Animal



MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN DE RESIDUOS DE
ANTIBIÓTICOS EN LECHE PARA SER UTILIZADO EN EL TAMBO

Autor:

Médico Veterinario Humberto Luis Occhi
TESIS DE MAESTRIA en Ciencias Veterinarias

Esperanza, Facultad de Ciencias Veterinarias (U.N.L.), diciembre 2012

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
Maestría en Ciencias Veterinarias
Mención Salud Animal



MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN DE RESIDUOS DE
ANTIBIÓTICOS EN LECHE PARA SER UTILIZADO EN EL TAMBO

Autor: Médico Veterinario Humberto Luis Occhi
TESIS DE MAESTRIA

Director Dr. Ing. Rafael Lisandro Althaus
Codirector Dr. Orlando Guillermo Nagel

Miembros del Tribunal de Tesis: Ing. Agr. Miguel Taverna

Med. Vet. PhD. Luis Calvino

Med. Vet. Msc. Eduardo Elizalde

Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias Veterinarias

Esperanza, diciembre de 2012

A mi esposa Stella y a mi hijo Mateo

AGRADECIMIENTOS

En primer término agradezco a la Universidad Nacional del Litoral como entidad madre y, a la Facultad de Ciencias Veterinarias, por constituirse en el ámbito de mi desarrollo y formación académica, y por posibilitarme un crecimiento individual y colectivo a través del ejercicio de la docencia e investigación.

También deseo expresar especialmente mi gratitud, al director de la tesis Dr Rafael Althaus y al codirector Dr. Orlando Nagel por sus enseñanzas, su paciencia y por alentarme de manera continua y entusiasta a la concreción de este trabajo.

ÍNDICE

	Página
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
II.1. Residuos de sustancias antimicrobianas en la leche.....	4
II.2. Sustancias antimicrobianas en medicina veterinaria.....	7
II.2.1. Características generales de los antimicrobianos.....	7
II.2.2. Clasificación de las sustancias antimicrobianas.....	8
II.3. Uso de antibióticos en tratamientos de bovinos productores de leche.....	15
II.3.1. Frecuencia de antimicrobianos empleados en el ganado vacuno lechero.....	18
II.3.2. Origen de la contaminación en la explotación lechera.....	25
II.4. Aspectos legales.....	26
II.4.1. Límite Máximo de Residuo.....	27
II.4.2. Tiempo de espera o período de seguridad de los animales tratados.....	30
II.5. Control de residuos de medicamentos en el tambo.....	32
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
III.1. Experimento 1. propiedades del método Rescreen [®]	36
III.1.1. Sistema Rescreen [®]	36
III.1.2. Método de referencia Delvotest [®] MCS.....	38
III.1.3. Estudio de especificidad.....	39
III.1.4. Estudio de límites de detección.....	40
III.1.4.1. Disoluciones de fármacos y muestras fortificadas.....	40

III.1.4.2. Límites de detección del método Resscreen® “BT” y “BS”.....	42
III.1.4.3. Interpretación de los resultados.....	44
III.1.4.4. Análisis estadístico de los resultados.....	45
III.1.4.5. Cálculo de los límites de detección del método Resscreen®	45
III.2. Experimento 2: utilización del método Resscreen® en tambo para la determinación del período de retiro de animales tratados.....	46
III.2.1. Animales y toma de muestra de leche.....	46
III.2.2. Análisis de muestras de leche.....	49
III.2.3. Análisis estadístico de los resultados.....	50
IV. RESULTADOS y DISCUSIÓN.....	51
IV.1. Experimento I. propiedades del sistema Resscreen®	51
IV.1.1. Estudio de especificidad.....	51
IV.1.2. Estudio de límites de detección.....	52
IV.2. Experimento 2: utilización del sistema Resscreen® en tambo para la determinación del período de retiro de vacas tratadas.....	74
IV.2.1. Animales con mastitis parenquimatosa tratados con sulfadoxina/trimetoprim.....	74
IV.2.2 Animales con mastitis catarral tratados con amoxicilina.....	76
IV.2.3 Animales con enfermedades podales tratados con tilosina.....	79
IV.2.4. Animales con retención de placenta tratados con oxitetraciclina.....	81
V. CONCLUSIONES.....	84
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	86

RESUMEN

Los residuos de antibióticos y sulfamidas en la leche destinada al consumo, pueden ocasionar diversos problemas, ya que estas sustancias no llegan a destruirse totalmente en la industria láctea, a través de la pasteurización y esterilización. Pudiendo ocasionar riesgos toxicológicos que afecten la salud de los consumidores como el desencadenamiento de alergias, anafilaxia, alteraciones en la flora intestinal y antibiorresistencias. También se debe considerar los inconvenientes que origina la presencia de estos en la industria láctea.

El trabajo consistió en la evaluación del bioensayo de inhibición microbiológica sistema Resscreen®, sin predifusión, para la detección de residuos de antibióticos en leche de vaca, a fin de evitar que la leche de los animales tratados por distintas patologías (mastitis, enfermedades podales y retención de placenta) con agentes antimicrobianos pertenecientes a diferentes grupos (betalactámicos, tetraciclinas, sulfamidas y macrólidos) llegue al consumidor y se introduzcan en la cadena alimentaria.

Se detectó que el sistema Resscreen® posee muy buena sensibilidad cuando se emplea con muestras de leche libres de antibióticos, con valores de 99,0 % para el bioensayo BT y de 98,4 % para el bioensayo BS, similares al método Delvotest MCS utilizado como control, que presentó una sensibilidad del 99,5 %, y detectó en animales tratados residuos de antibióticos betalactámicos, tetraciclinas, sulfamidas y tilosina en niveles cercanos a sus respectivos LMRs.

PALABRAS CLAVES: residuos antimicrobianos, sistemas microbiológicos, tratamiento

METHODS FOR DETECTING ANTIBIOTIC RESIDUES IN MILK TO BE
USED IN DAIRY FARMS

SUMMARY

Residues of antibiotics and sulfonamides in milk for consumption can cause various problems, as these substances do not reach completely destroyed in the dairy industry, through pasteurization and sterilization may cause toxicological risks affecting the health of consumers and triggering allergies, anaphylaxis, alterations in the intestinal flora and antibiotic resistance. One should also consider the disadvantages incurred in the presence of these dairy industry.

The work consisted in assessing microbiological inhibition bioassay Resscreen ® system without pre diffusion, for the detection of antibiotic residues in dairy milk, to prevent the milk from treated animals for various diseases (mastitis, foot diseases and retained placenta) with antimicrobial agents from different groups (beta-lactams, tetracyclines, sulfonamides, and macrolides) reaches the consumer and entering the food chain.

It was found that the system Resscreen ® has very good sensitivity when used with milk samples free of antibiotics, with values of 99.0% for bioassay 98.4% BT and BS for the bioassay similar to the method used Delvotest MCS as a control, which had a sensitivity of 99.5%, and detected in animals treated waste betalactam antibiotics, tetracyclines, sulfonamides and tylosin in levels close to their respective MRLs.

Key Words: antimicrobial residues, microbiological systems, treatment

I. INTRODUCCIÓN

Los residuos de antibióticos y sulfamidas en la leche destinada al consumo, pueden ocasionar diversos problemas; ya que estas sustancias no llegan a destruirse totalmente con los tratamientos térmicos que se aplican en la industria láctea, tales como la pasteurización y la esterilización (Odat y Hiwaki, 1996; Zorraquino et al., 2003; Zorraquino 2005; Zorraquino et al., 2008,2009a, 2009b, 2010), motivo por el cual, una vez que se incorporaron en la cadena alimenticia pueden llegar al consumidor aún después de haber sido sometidas a estos tratamientos térmicos.

Entre los riesgos toxicológicos que pueden producir los residuos de antibióticos en la salud de los consumidores se destacan: desencadenamiento de alergias por sensibilidad que, en casos extremos pueden llevar a la anafilaxia, alteraciones en la flora intestinal (Archimbault, 1983; Debackere, 1995; Macri y Mantovani, 1995), las cuales pueden ser la causa de desarrollo de antibio-resistencias y en algunos casos efectos tóxicos (Moretain, 1996; Heeschen, 1997).

También se debe considerar los inconvenientes que origina la presencia de residuos de antimicrobianos a la industria láctea. Desde el punto de vista tecnológico, la presencia de antibióticos en la leche puede resultar perjudicial para la fabricación de los productos fermentados, ya que en muchos de los procesos bacterianos se enlentecen o incluso se inhiben completamente (Brady y Katz, 1988), dando como resultado pérdidas económicas de gran importancia. Es de destacar el retraso en la acidez y una mayor dificultad en el cuajado, obteniéndose como consecuencia de ello, quesos de menor calidad por dificultad en la maduración (Mourot y Loussouorn, 1981).

En la elaboración de yogur, Del Prato (1997) observa problemas, ya que el desarrollo del *Streptococcus salivarius* var. *thermophilus* se dificulta cuando la leche

posee 500-5.000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de estreptomicina, 50-100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de cloranfenicol o 1-10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de tetraciclina. A todo esto, se debe agregar las pérdidas económicas que ocasionan los residuos de antibióticos a la industria láctea, al no producirse el cuajado en las cubas, siendo necesario su desecho (Moretain, 1996).

Para evitar estos inconvenientes, los actuales sistemas de control de residuos de medicamentos previenen llevar a cabo etapas preventivas desde el lugar donde se originan estos residuos, es decir, desde el propio tambo. Estos programas higiénicos sanitarios establecen la implementación de un Análisis de Riesgos y Control de Puntos Críticos (HACCP), basados fundamentalmente en una serie de puntos a chequear en las explotaciones ganaderas (Heeschen, 1993).

Para ello, deben emplearse medicamentos seguros, autorizados por organismos oficiales (SENASA), además de respetar las dosis, las vías de administración y los períodos de retiro de la leche (Zorraquino, 1996). Sin embargo, estas medidas no resultan suficientes para garantizar la inocuidad de la leche en lo que concierne a residuos de antibióticos. Además, debe verificarse en la misma explotación ganadera que la leche procedente de animales tratados con antibióticos esté libre de residuos antes de incorporar la leche de estos animales a la cadena alimenticia.

Esta etapa plantea la necesidad que los tambos dispongan de métodos de screening debidamente validados por organismos oficiales como el Instituto Nacional de Tecnología industrial (INTI) para el control de los residuos de antibióticos en la leche de animales tratados (INTI-UNL, 2010).

Por todo ello, y a fin de evitar los problemas que ocasionan los residuos de antibióticos en la leche, resulta necesario evaluar la implementación de un kit para la detección de residuos de antibióticos en el propio tambo, de forma tal de evitar que la leche con residuos de antibióticos llegue a la industria láctea.

La presente Tesis persigue como objetivo la evaluación del sistema Resscreen® para la detección de residuos de antibióticos en leche de tambo a fin de evitar que la leche de estos animales tratados llegue al consumidor y se introduzcan en la cadena alimentaria. Los objetivos científicos y técnicos específicos son los siguientes:

1. Evaluar un bioensayo de inhibición microbiológica mediante la determinación de los principales parámetros que caracterizan al método de screening tales como especificidad y límites de detección del bioensayo.

2. Analizar la implementación del sistema Resscreen® en el propio tambo, mediante el análisis de la cinética de eliminación de cuatro tratamientos farmacológicos en bovinos afectados con procesos infecciosos, utilizando agentes antimicrobianos pertenecientes a diferentes grupos (betalactámicos, tetraciclinas, sulfamidas y macrólidos) a fin de evaluar la utilización de un método de screening en el propio tambo que pueda ser utilizado dentro de un programa para la prevención de residuos de medicamentos en leche.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1. RESIDUOS DE SUSTANCIAS ANTIMICROBIANAS EN LA LECHE

El concepto de calidad en la leche ha cobrado últimamente, cada vez más importancia, debido a la actuación que ha tenido lugar por parte de la industria láctea, que requiere una materia prima con características adecuadas para la elaboración de sus productos. Además, el consumidor demanda alimentos de calidad y producidos con criterios de seguridad alimentaria. Por último, el productor lechero, esta cada vez más interesado en obtener un producto de calidad, sobre todo cuando se le retribuye en conseguir un mejor precio por el mismo.

También la calidad higiénico-sanitaria de los alimentos es uno de los aspectos cada vez más importantes que se exige por la legislación. Varios parámetros higiénicos, como la presencia de microorganismos patógenos, residuos y contaminantes, son factores decisivos en la calidad e inocuidad de los alimentos y, por tanto, en la protección del consumidor.

La legislación Comunitaria a través de las Directivas 46/92 (CEE, 1992a) y 71/94 (CEE, 1994) realiza una valoración de la calidad de la leche no sólo sobre la base de la composición, sino también, de aquellos elementos indeseables para el producto que, son extraños al mismo (agua añadida e inhibidores) o superan los límites admisibles (bacterias y células somáticas).

Así, en la leche se pueden encontrar residuos de diferente origen, composición química y toxicidad que son originados por los sistemas modernos utilizados en las explotaciones agrarias en general (herbicidas, plaguicidas, etc) y en los tambos en particular, debido al tratamiento de los animales con diferentes fármacos, además de otros residuos que proceden de la utilización de detergentes y/o desinfectantes.

Los tratamientos farmacológicos, según la composición intrínseca de la

molécula, excipiente, dosis y vía de administración, generan residuos (sustancia original y/o metabolitos) que pueden persistir durante un mayor o menor tiempo tanto en los animales tratados así como también en los productos elaborados (Bevil, 1989; Debackere, 1995).

El Reglamento 2377/90 (CEE, 1990) 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”*.

Actualmente, los residuos más importantes que aparecen en la leche, son los Residuos de Medicamentos Veterinarios (RMV), especialmente los antimicrobianos (que comprenden los antibióticos y las sulfonamidas). El empleo de estas sustancias en el tratamiento de las enfermedades infecciosas de la ubre, principalmente en la mastitis, está recomendado para su control (Miller, 1995). Estos medicamentos producen residuos de antimicrobianos en la carne y en la leche, que pueden encontrarse por encima de los límites de seguridad establecidos por la legislación.

La normativa europea, respecto a los RMV viene marcada por la entrada en vigor del Reglamento 2377/90 (CEE, 1990). En este reglamento se fijan las concentraciones máximas de Residuos de Medicamentos Veterinarios (Límites Máximos de Residuos, LMRs) que pueden encontrarse en los alimentos de origen animal, entre ellos la leche, para proteger al consumidor de posibles riesgos toxicológicos de dichos residuos.

La lista de residuos de drogas veterinarias, incluidos los antibióticos, que pueden encontrarse en los productos de origen animal, entre los cuales está la leche, se definen en las Regulaciones de la Comisión de la Unión Europea 2377/90 (CEE, 1990), 675/92

(CEE, 1992b) y 3093/92 (CEE, 1992c) y una serie de enmiendas que posteriormente se han realizado, principalmente para ampliar la lista de los compuestos cuyos LMR fueron establecidos.

La Directiva 23/96 (CEE, 1996) se refiere a las medidas de control aplicables a determinadas sustancias, así como también a sus residuos en animales vivos y productos derivados. Establece además los LMRs de los compuestos químicos que pueden estar presentes en los productos de origen animal tales como la leche.

En la actualidad, la Unión Europea mediante la Directiva 657/2002 (CEE, 2002) clasifica a los métodos de análisis para la detección de sustancias inhibidoras en la leche en dos grandes grupos, los métodos cualitativos y los cuantitativos, basados principalmente en sus características y metodología analítica.

Recientemente, la Comisión del Codex Alimentarius ha establecido los niveles seguros de los antimicrobianos en los tejidos comestibles, en forma similar a la Unión Europea que regula los límites máximos de residuos (LMRs) mediante el Reglamento 37/2010/CE (CEE, 2010) incluyendo a la leche y otros productos alimenticios de origen animal.

Además, por el potencial riesgo para la salud humana que representan, los residuos y contaminantes, englobados en la mayor parte, dentro de lo que se conoce como sustancias inhibidoras, ocupan un lugar importante a la hora de definir la calidad y seguridad de un producto alimentario. De ahí la necesidad de localizar su origen, controlar su presencia y evitar su llegada a la industria transformadora y al consumidor.

II.2. SUSTANCIAS ANTIMICROBIANAS EN MEDICINA VETERINARIA

II.2.1. Características generales de los antimicrobianos

Los antimicrobianos, y dentro de estos los antibióticos, se pueden definir de forma general como un producto del metabolismo microbiano que es capaz de inhibir el crecimiento o provocar la lisis de otros microorganismos (Mateos, 2002).

Las sustancias antimicrobianas han sido utilizadas en el tratamiento de enfermedades del ganado desde poco después de su descubrimiento (Honkanen-Buzalski y Reybroeck, 1997).

Sin embargo, el descubrimiento de la penicilina, en el año 1928, supuso uno de los hechos más relevantes en la historia de la farmacología, ya que se trataba de una sustancia quimioterapéutica natural para luchar contra los procesos infecciosos. Desde este momento se iniciaron las investigaciones y el desarrollo de los antibióticos (Heeschen y Blüthgen, 1991).

Las propiedades que se buscan en un antibiótico para ser utilizado en el tratamiento de enfermedades infecciosas (Rang *et al.*, 2000) se pueden resumir en:

- Elevada actividad antimicrobiana, eficaz y selectiva; y que no se vea reducida por la biotransformación que sufra en el cuerpo.
- Las características farmacocinéticas deben proporcionar valores en los lugares de acción altos, y ser mantenidos durante tiempos largos.
- Baja toxicidad para el huésped.
- Que sea eficaz por vía tópica, oral o parenteral.
- De alta penetrabilidad.
- Que sea estable, no lábil.
- Fácil de producir en grandes cantidades y a bajo costo.

Se debe destacar que reunir todas las características mencionadas anteriormente en una única sustancia, es prácticamente imposible, por lo que se recurre a combinaciones de antimicrobianos para mejorar la efectividad de los tratamientos. Sin embargo, no todas las combinaciones de estas sustancias son viables debido a la incompatibilidad química de su estructura (Löscher, 1994).

II.2.2. CLASIFICACIÓN DE LAS SUSTANCIAS ANTIMICROBIANAS

La clasificación de las sustancias antimicrobianas se puede realizar de diversas formas y sobre la base de diferentes criterios, tales como su origen, su modo de acción o su estructura química.

Actualmente, aunque se considera que todos los sistemas de clasificación son válidos, el sistema más utilizado por la comunidad científica es el que agrupa a estos compuestos por similitud química, según los núcleos base de sus estructuras, que les confieren cierta semejanza en sus propiedades físico-químicas y farmacológicas.

En la Tabla 1 se presenta una clasificación según las estructuras químicas de los agentes antimicrobianos realizada a partir de diferentes autores (Archimbault, 1983; Sumano y Ocampo, 1997; Merck & CO, 2000).

Por otra parte, y de acuerdo con el mecanismo de acción, los agentes antimicrobianos se pueden clasificar en:

1. Agentes que inhiben la síntesis de la pared celular de la bacteria: antibióticos betalactámicos, bacitracina, entre otros.
2. Sustancias que afectan la permeabilidad de la membrana celular: polimixinas, entre otros.

3. Agentes que inhiben la síntesis proteica a nivel ribosomal: cloranfenicol, tetraciclinas, macrólidos, aminoglucósidos, y otros.
4. Fármacos que afectan el metabolismo de los ácidos nucleicos: rifampicina, entre otros.
5. Antimetabolitos que impiden la síntesis del ácido fólico, como sulfonamidas, y los nitrofuranos.
6. Inhibidores de la topoisomerasa: quinolonas, fluoroquinolonas, y otras.

El grupo denominado antibióticos betalactámicos, está constituido por las penicilinas y las cefalosporinas. Se trata de un grupo de antibióticos, al igual que sus derivados, ampliamente distribuido en la terapia contra la mastitis en el ganado lechero (Honkanen-Buzalski y Reybroeck, 1995).

Las penicilinas y las cefalosporinas son sustancias similares desde el punto de vista de su estructura química y de sus mecanismos de acción, aunque difieren en lo que respecta a su espectro antibacteriano y su farmacocinética.

Los antibióticos betalactámicos previenen la transpeptidación entre cadenas de peptidoglicanos, inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana. Aunque hoy en día, las penicilinas y las cefalosporinas son los antibióticos betalactámicos más utilizados, en los últimos años se ha avanzado mucho en el desarrollo de nuevas sustancias como los inhibidores de la beta-lactamasa, las carbapemas y los monobactámicos (Adams, 2003).

Tabla 1. Clasificación de los diferentes agentes antimicrobianos

Grupos	Familias	Antimicrobianos
Betalactámicos: Poseen en su estructura el anillo betalactámico		
Penicilinas	Naturales	Penicilina G, penicilina V
	Aminopenicilinas	Amoxicilina, ampicilina
	Resistentes a β-lactamasas	Oxacilina, cloxacilina, dicloxaciclina, nafacilina
	Amplio espectro	Ticarcilina, carbencilina
Cefalosporinas	Primera generación	Cefalotina cefapirina, cefalexina, cefadroxil,
	Segunda generación	Cefuroxima, ceforanida, cefamandol, cefoxitina
	Tercera generación	Ceftiofur, ceftriaxona, cefotaxima, cefoperazona
	Cuarta generación	Cefepima, cefquinoma
Otros	Carbapenems	Imipenem
	Monobactamas	Aztreonam
	Acido Clavulánico	
Aminoglucósidos: Consisten en azúcares aminados y un anillo llamado aminociclitol		
	Espectro reducido	Estreptomina, dihidroestreptomina
	Diversos	Neomicina, kanamicina, gentamicina, tobramicina Apramicina
Macrólidos: Poseen en su estructura un anillo lactónico con azúcares aminados.		
	Anillo 12 constituyentes	Sin uso en práctica clínica
	Anillo 14 constituyentes	Eritromicina, oleandomicina,
	Anillo 16 constituyentes	troleandomicina Tilosina, espiramicina, josamicina
Quinolonas: Derivados del ácido carboxílico (A.C.)		
	Primera generación	Ácido nalidíxico, Á. pipemídico, Á. oxocínico
	Segunda generación	Flumequina, ciprofloxacina, norfloxacina
	Tercera generación	Enrofloxacin, danofloxacin, sarafloxacin
Tetraciclinas: Tienen en común en su estructura el anillo naftaleno (4 anillos)		
	Acción corta	Tetraciclina, oxitetraciclina, clortetraciclina
	Acción intermedia	Demetilclortetraciclina, metaciclina
	Acción prolongada	Doxiciclina, minociclina
Sulfonamidas: El núcleo básico es p-amino-bencenosulfonamida		
	Uso habitual	Sulfatiazol, sulfametazina, sulfadiazina
	Muy solubles (urinarias)	Sulfisoxazol, sulfasomidina
	Poco solubles (entericas)	Sulfaguanidina, succinilsulfatiazol
	Potenciadas	Sulfonamidas + diaminopirimidinas
	Uso tópico	Sulfacetamida, sulfadiazina de plata
Otros antimicrobianos: Cloranfenicol y derivados, Lincosamidas, Polimixinas, Bacitracinas, Rifamicinas, Nitrofuranos, Nitromidazoles, etc		

Hay que señalar que el consumo de antibióticos betalactámicos, solos o combinados, casi se ha triplicado como consecuencia de la comercialización de algunas moléculas concretas: amoxicilina-clavulánico, cefalexina, ceftiofur y cefquinoma, que han desplazado a la asociación clásica ‘penicilina-estreptomicina’ de gran éxito terapéutico (Marco *et al.*, 2001).

Respecto a las cefalosporinas, en el ganado vacuno productor de leche se utilizan principalmente en preparaciones intramamarias en la profilaxis de secado y mastitis durante el período de lactación. Otros usos terapéuticos de estas sustancias son el tratamiento intrauterino de la metritis y el tratamiento parenteral de infecciones sistémicas del ganado vacuno, aunque también se emplean para el ganado ovino, caprino y porcino (Botsoglou y Fletouris, 2001).

La mayoría de las cefalosporinas se excretan por secreción renal, aunque la eliminación biliar de los compuestos más recientes, tales como la cefoperazona, puede ser importante (Merck & CO, 2000).

Hay que resaltar que las cefalosporinas son agentes que pueden producir efectos adversos importantes tales como reacciones alérgicas de hipersensibilidad similares a las producidas por las penicilinas, nefrotoxicidad y otros efectos como diarreas y reacciones hematológicas (Adams, 2003).

Actualmente, su utilización para el tratamiento de la mastitis en el ganado lechero se está limitando a favor de los antibióticos llamados de “nueva generación” como las cefalosporinas de 3ª y 4ª generación, nuevas moléculas de aminoglucósidos y las fluoroquinolonas (Busani *et al.*, 2003, 2004).

Las tetraciclinas, por su parte, son los antibióticos más utilizados mundialmente en producción animal debido a su amplio espectro de acción que inhibe el crecimiento de una extensa variedad de bacilos y cocos “gram positivos” y bacilos “gram negativos”

(*Brucella*, *Legionella pneumophyla*, *Helicobacter pilory*, *Borrelia recurrentis*), así como *Rickettsia*, *Mycoplasma*, *Chlamydia* y Espiroquetas (Cinquina *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2004)

Se usan principalmente para tratar infecciones sistémicas en ganado vacuno como enteritis bacterianas, metritis, etc. y locales como la queratoconjuntivitis infecciosa y clamidiasis, además de otras enfermedades específicas.

En general, entre el 50 y el 80% de las tetraciclinas se excretan principalmente por vía renal y entre el 10 y el 20% por la bilis. También se eliminan en la leche, alcanzando concentraciones máximas a las 6 horas de la administración parenteral y detectándose pequeñas cantidades hasta las 48 horas después del tratamiento (Merck & CO, 2000).

Respecto a las sulfamidas, su mecanismo de acción es complejo ya que actúan bloqueando distintas enzimas entre las que se encuentran las implicadas en la síntesis de las bases púricas y otros procesos celulares, dando lugar a la supresión de la síntesis proteica, alteración de los procesos metabólicos e inhibición del crecimiento y multiplicación de los microorganismos.

Estos quimioterapéuticos inhiben las bacterias “gram negativas” y “gram positivas”, algunas *Clamidias*, *Nocardia*, *Actinomyces* spp, y diversos protozoos. Las sulfamidas más activas pueden actuar frente varias especies de *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Salmonella*, *Pasteurella* e incluso *Escherichia coli*.

Las sulfonamidas se usan normalmente para tratar o evitar enfermedades sistémicas o locales. Entre las infecciones que se tratan con estos fármacos, se destacan coccidiosis, mastitis, metritis, colibacilosis, poliartritis, infecciones respiratorias y toxoplasmosis.

La mayoría de las sulfonamidas se excretan principalmente en la orina, mientras que la bilis, las heces, la leche y el sudor constituyen vías de eliminación de menor importancia (Merck & CO, 2000).

Otros antimicrobianos empleados en medicina veterinaria son los antibióticos aminoglucósidos que en general, se utilizan para el tratamiento de una gran variedad de infecciones entéricas, respiratorias y otras infecciones causadas por gérmenes “gram negativos”, como la colibacilosis y salmonelosis de terneros y cerdos (Adams, 2003).

Todos los antibióticos de este grupo (estreptomicina, gentamicina, kanamicina, neomicina, etc.) presentan propiedades farmacocinéticas y efecto bactericida similares, puesto que interactúan con el ribosoma bacteriano asociado a la membrana celular.

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

Por su parte, el grupo de los macrólidos está constituido por un conjunto de compuestos estructuralmente emparentados, que se caracterizan por poseer un anillo lactónico macrocíclico de 12 a 20 átomos de carbono. Estos anillos se encuentran unidos desoxiazúcares mediante enlaces glucosídicos. Los miembros del grupo incluyen principalmente a la eritromicina, tilosina, espiramicina, entre otros.

Los macrólidos son activos frente a la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias “gram positivas” (con limitada o nula actividad frente a la mayoría de bacterias “gram negativas”), aunque hay variaciones considerables con respecto a su potencia y actividad.

Las indicaciones generales incluyen infecciones de las vías respiratorias

superiores, bronconeumonía, enteritis bacteriana, metritis, piodermatitis, infecciones urinarias, artritis y otras.

Otro grupo importante de antibióticos utilizados en la actualidad, son las quinolonas y fluoroquinolonas. Se trata del grupo farmacológico de mayor desarrollo en los últimos años y su uso en medicina veterinaria se ha incrementado en gran medida.

Estos productos son fármacos antibacterianos sintéticos que presentan una estructura quinolónica común. Los distintos radicales químicos y cadenas laterales son los responsables de las diferentes características físicas de cada fármaco.

Se distinguen tres generaciones de quinolonas con potencia antibacteriana y características farmacológicas progresivamente mejores: quinolonas de 1ª generación (ac. nalidíxico, ac oxocínico), de 2ª generación (flumequina, norfloxacin) y de 3ª generación (enrofloxacin, danofloxacin, sarafloxacin) (Sumano y Ocampo, 1997; Merck & CO, 2000).

En los últimos años, se advierte un incremento en el uso de estos compuestos en la clínica veterinaria bovina para el tratamiento de las enteritis neonatales y enfermedades respiratorias. En algunos casos, para el tratamiento sistémico de la mastitis colibacilar (Busani *et al.*, 2004).

Además de estos grupos de antimicrobianos existen otros compuestos que no se engloban en ningunas de las familias mencionados anteriormente, pero son importantes a nivel productor. Entre ellos se destacan los antibióticos glucopeptídicos, sobretudo la vancomicina con acción bactericida eficaz frente a bacterias “gram positivas”, los antibióticos polimixinas donde la polimixina B y la colistina son las dos sustancias de principal uso con efecto bactericida rápido y selectivo en bacilos “gram negativos” y la bacitrina, antibiótico polipeptídico con un gran espectro de actividad, muy activo frente a microorganismos “gram positivos” y de efectos tóxicos graves en el riñon.

II.3. USO DE ANTIBIÓTICOS EN TRATAMIENTOS DE BOVINOS PRODUCTORES DE LECHE

Actualmente, las principales enfermedades infecciosas del ganado vacuno son mastitis, metritis, neumonías, enteritis y afecciones podales (Zwald *et al.*, 2004; Sawant *et al.*, 2005). Para el tratamiento de estas patologías, es frecuente el uso de medicamentos veterinarios que contienen antimicrobianos.

En el caso del ganado productor de leche, la mastitis es una de las patologías más frecuentes que conlleva a enormes pérdidas económicas y gastos veterinarios (Gruet *et al.*, 2001; Sawant *et al.*, 2005).

No es extraño por lo tanto, que la mayor parte de los residuos de sustancias antibacterianas detectadas en la leche, procedan de los tratamientos terapéuticos relacionados con la glándula mamaria (hasta un 90% de los casos), ya sea por los tratamientos ligados a mamitis clínicas, o por las terapias preventivas que se emplean en el período de secado (Fabre *et al.*, 1995; Erskine *et al.*, 2003).

En efecto, Miller (1995) destaca que las sustancias utilizadas en el tratamiento de las enfermedades infecciosas de la ubre del ganado lechero, son muy comunes de encontrar en la leche.

El impacto de las mastitis ha dado lugar al desarrollo de diversas estrategias terapéuticas para controlar las infecciones. Así, se utilizaron numerosos productos con fines terapéuticos y/o profilácticos (antimicrobianos, antiinflamatorios, vacunas, vitaminas, citoquinas, homeopatía) y se ensayan distintas rutas de administración, tales como sistémica e intramamaria (Gruet *et al.*, 2001).

En el tratamiento de las denominadas “mastitis clínicas” se utilizan preparados de acción y eliminación rápida. Los tratamientos “de secado” pueden ser más

peligrosos, puesto que una aplicación por error a una vaca que se encuentra en su lactación, puede ocasionar una contaminación de la leche durante períodos de 4 a 8 semanas.

En cuanto a las vías de administración, los tratamientos veterinarios que originan una mayor frecuencia de residuos en la leche son aquellos de tipo intramamario, por aplicarse directamente en la glándula mamaria, objeto de dicha administración. Estos tratamientos, si bien logran una elevada eficacia terapéutica por su acción local, por el otro lado, producen una mayor excreción del antibiótico con la leche procedente de los animales tratados.

Entre los antibióticos más frecuentemente utilizados se destacan los betalactámicos (penicilinas y cefalosporinas) por ser eficaces contra los microorganismos patógenos que causan mastitis (Estafilococos y Estreptococos).

Además, los denominados “partos prematuros” constituyen un potencial riesgo que puede presentarse durante los “tratamientos de secado”. En efecto, cuando una vaca tratada durante su fase de secado adelanta su parto y, no se respeta un tiempo mínimo de 8 semanas desde la aplicación del antibiótico, la leche puede contener residuos procedentes del tratamiento. Por ello, el productor debe registrar la fecha de aplicación, la fecha de parto y calcular el tiempo transcurrido entre aplicación del tratamiento y el parto estimado.

En todos los casos, tanto en los tratamientos empleados en el período de secado mediante preparados de eliminación lenta, como en los tratamientos de animales en etapa de lactación con preparados de eliminación rápida, resulta necesario el respeto de los "períodos de seguridad" y el "control en el tambo", a fin de garantizar que la leche esté libre de residuos a niveles superiores a los LMRs.

Por otra parte, Honkanen-Buzalski y Reybroeck (1995) señalan que el uso de

medicamentos fuera de las especificaciones de etiquetaje (“extra-label use”) es una de las principales causas de la presencia de residuos en la leche.

En resumen, los antimicrobianos se pueden utilizar en dos fases del ciclo productivo. En una primer etapa, para tratar vacas en lactación con problemas de mastitis clínicas o subclínicas y en una segunda etapa para reducir las infecciones subclínicas durante el período de secado y de este modo aumentar la vida productiva del animal (Gruet *et al.*, 2001; Erskine *et al.*, 2003). En cualquier caso, la terapia más adecuada debe basarse en el conocimiento previo de la etiología de la infección (Méndez *et al.*, 1999).

Con respecto a otros tratamientos del ganado vacuno, se debe destacar que después de la mastitis (que representa el 85% de las patologías), son frecuentes las metritis y las afecciones podales (Zwald *et al.*, 2004; Sawant *et al.*, 2005), aunque tampoco se debe subestimar las neumonías, diarreas, eczemas, furunculosis, etc. Para el tratamiento de las afecciones podales y las metritis de naturaleza infecciosa se indican asociaciones de penicilinas y estreptomicina, cefalosporinas de 1^a, 2^a y 3^a generación, oxitetraciclina, macrólidos y sulfonamidas (Veterindustria, 2006).

Un estudio llevado a cabo en Suiza (Diserens *et al.*, 2005) durante el período comprendido entre los años 2003 y 2004, señala que el 74,6% de los tratamientos fueron de tipo intramamario (44,2 % durante el secado y 30,4 % para la mastitis), mientras que los tratamientos en el parto (10,0 %), tracto digestivo (5,5%), pezones (1,5%) y pulmones (1,3%) son menos frecuentes, según se muestra en la Figura 1.

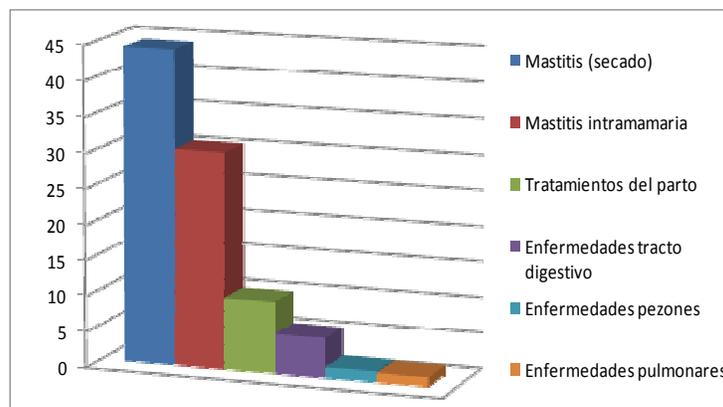


Figura 1. Frecuencia de tratamientos de patologías del ganado vacuno que emplean sustancias antimicrobianas (Diserens *et al.*, 2005).

Hay que señalar que algunos productores no respetan las pautas establecidas en el manejo de los medicamentos, especialmente en lo que se refiere a tiempo de espera, dosis de administración, frecuencias, etc. Como consecuencia de ello, pueden aparecer residuos de estos medicamentos en la leche a niveles superiores a los LMRs ocasionando problemas para la salud pública y la industria agroalimentaria.

II.3.1. Frecuencia de antimicrobianos empleados en el ganado vacuno lechero

Los estudios de frecuencia del consumo de los distintos grupos de antimicrobianos (penicilinas, cefalosporinas, tetraciclinas, sulfamidas, aminoglucósidos, macrólidos, quinolonas, etc.) para su uso terapéutico en animales, son muy reducidos. Al respecto, Bywater (2004) asegura que la recopilación de datos es un trabajo difícil de realizar, debido en parte a la existencia de un mercado de fármacos genéricos desconocido entre las fronteras. Además, se debe agregar el hecho que no todas las compañías farmacéuticas están asociadas a grandes organizaciones industriales, situación que dificulta aún más la recolección de la información.

Actualmente, se puede considerar como datos disponibles y fiables a aquellos que ofrecen los distintos gobiernos a través del contacto directo con las compañías farmacéuticas, como el caso del Reino Unido, y los datos que proceden de la obligación oficial de informar acerca de todas las ventas llevadas a cabo en algunos países como Dinamarca, Finlandia y Suecia (Sarmah *et al.*, 2006).

Por todos estos motivos, la recopilación y procesamiento de datos sobre consumo y/o distribución de antimicrobianos en el área de la sanidad animal a nivel mundial es una tarea muy dificultosa de realizar. Los datos oficiales más actualizados que se dispone en la Unión Europea (IFAH-Europa, 2006) han sido seleccionados en base a un estudio ponderado de los distintos principios activos empleados en sanidad animal en el período comprendido entre los años 1997 y 1999. Se desglosa en dicho estudio que los antibióticos betalactámicos (9%) unidos a las tetraciclinas (66%) y los macrólidos (12%) representan juntos el 86% del uso terapéutico total de antimicrobianos en el sector veterinario, seguidos en una menor proporción por los aminoglucósidos (4%), sulfonamidas (2%) y fluoroquinolonas (1%).

Según Gruet *et al.* (2001), el número de sustancias disponibles en Europa para el tratamiento de mastitis no es muy elevado, ya que la mayor parte de los principios activos comerciales se encuentran incluidos en el grupo de los betalactámicos o se trata de combinaciones de éstos con algún macrólido, quinolona o aminoglucósido.

Al respecto, Diserens *et al.* (2005) realizan un estudio sobre el uso de antibióticos en vacas lactantes durante los tratamientos de mastitis y secado, que comprende 629 formulaciones en 23 países de la CEE. La Figura 2 presenta la frecuencia de los antibióticos más empleados en estas formulaciones. Se observa que del total de productos farmacéuticos estudiados, las moléculas más utilizadas son cloxacilina (32,7%), penicilina (23,4%), ampicilina (15,6%), neomicina (14,9%),

seguidas en menor importancia por dihidroestreptomicina (9,5%), cefalexina (5,1%), lincomicina (4,3%) y en menores proporciones amoxicilina, cefapirina y cefoperazona.

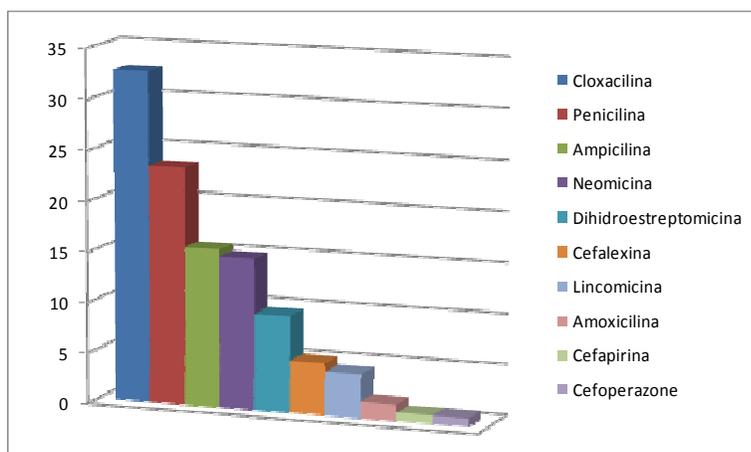


Figura 2. Frecuencias de antibióticos utilizados en formulaciones farmacéuticas de productos veterinarios para el tratamiento de la mastitis (Diserens *et al.*, 2005).

En España, para el caso concreto de la mastitis, Zorraquino *et al.* (2007) elaboraron un estudio para el Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino antes Ministerio Agricultura, Pesca y Alimentación, donde se calcularon las frecuencias de utilización de antibióticos en los tratamientos intramamarios durante el año 2006, basándose en los preparados vendidos durante ese año por los laboratorios asociados a Veterindustria y encuestas efectuadas a un 25% de las explotaciones de vacuno lechero (6.618 explotaciones), que representan el 11% del censo vacuno de leche en España.

El mencionado trabajo revela que, en los tratamientos intramamarios de vacas en lactación, los antibióticos betalactámicos (39% penicilinas y 11% cefalosporinas) son las moléculas más empleadas contra la mastitis, seguidos por los aminoglucósidos (34%) y en menor proporción por las tetraciclinas, sulfamidas, macrólidos, etc.

Con respecto a las moléculas más empleadas en estos tratamientos, se destacan neomicina (34,5%), penicilina (25,1%), estreptomicina (23,8%), ampicilina (18,3%), amoxicilina (16,9%), kanamicina (15,9%), ácido clavulánico (15,3%), cefalexina

(14,5%), gentamicina (11,4%), dicloxacilina (10,5%), cloxacilina (9,5%), cefoperazona (6,0%) y cefquinoma (5,4%), tal como se expone en Figura 3.

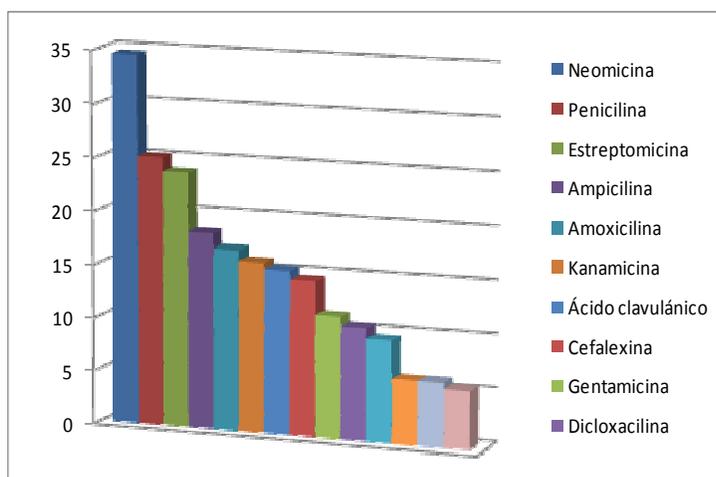


Figura 3. Frecuencia de antibióticos utilizados en los tratamientos intramamarios en vacas en lactación de España durante el año 2006 (Zorraquino *et al.*, 2007).

En Argentina, sobre un total de 37 formulaciones comerciales de antibióticos empleados para el tratamiento intramamario de la mastitis, las penicilinas (48,6 % cloxacilina, 37,8 % ampicilina, 18,9 % amoxicilina, 5,4% penicilina) son las más utilizadas, seguidas por los aminoglucósidos (10,8 % neomicina, 8,1 % estreptomicina), las cefalexinas (10,8 % cefalexina, 2,7 % cefapirina), los macrólidos (8,1 % eritromicina) y en menor frecuencia otros antibióticos como rifaximina (2,7 %), lincomicina (2,7 %) y sulfamidina con trimetoprim (2,7 %), aunque la mayoría de las formulaciones utilizan combinaciones de dos antimicrobianos

Para los tratamientos por vía parenteral (inyectables) de la mastitis de vacas durante el período de lactación, los datos del análisis de las encuestas realizadas por Zorraquino *et al.* (2007) destacan que las moléculas de mayor uso (Figura 4) son penicilina (43,1%), enrofloxacina (17,3%), amoxicilina (12,1%), cefquinoma (7,7%) y ácido clavulánico (7,3%), seguido en menor importancia por gentamicina (5,8%), estreptomicina (4,4%) y espiramicina (3,4%).

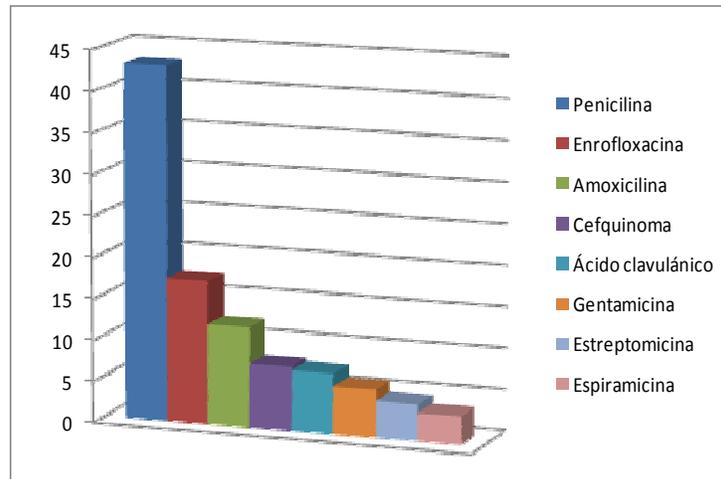


Figura 4. Frecuencia de antibióticos utilizados en los tratamientos inyectables en vacas en lactación de España durante el año 2006 (Zorraquino *et al.*, 2007).

Con respecto a la fase del secado, dichos autores señalan que los antibióticos más utilizados en la forma intramamaria (Figura 5) corresponden a penicilina (62,4%), cloxacilina (32,6%), neomicina (27,1%), cefalonio (18,2%), ampicilina (3,0%), cefquinoma (2,4%), cefapirina (2,3%) y cefalexina (2,3%). Además, Zorraquino *et al.* (2007) realizan un análisis de riesgos teniendo en cuenta las frecuencias de los diferentes tratamientos (70% para intramamario, 20 % para secado y 10% para inyectable) y factores de ponderación específicos para cada molécula según las prescripciones excepcionales (“extra-label use”) por parte del veterinario o no autorizado (“off-label use”) por parte del productor. Los riesgos relativos son 61% para betalactámicos, 27% para aminoglucósidos, 3% para colistina, 2% para quinolonas, sulfamidas y trimetoprim y 1% para novobiocina y tetraciclinas. Destacan finalmente que, se respetan en un 85% los períodos de seguridad cuando se emplean medicamentos de uso autorizado. El riesgo de contaminación de la leche con residuos de antibióticos provienen del uso de medicamentos “extra-label”, del uso “poco prudente” por parte del veterinario, o como una consecuencia del “mal uso” o uso “no autorizado” por parte del productor, es más elevado.

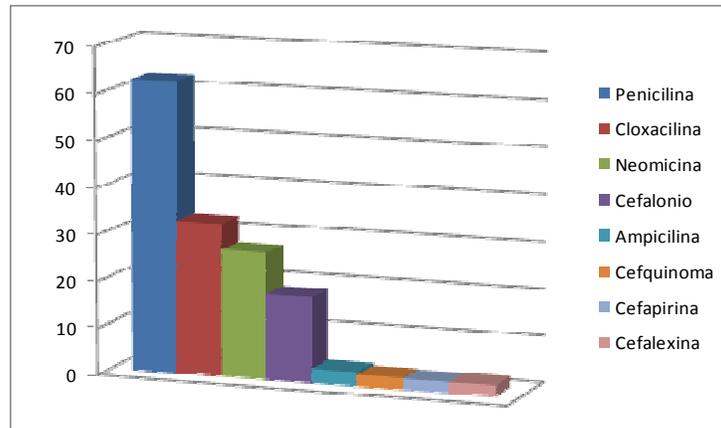


Figura 5. Frecuencia de antibióticos utilizados en los tratamientos inyectables en vacas en período de secado de España durante el año 2006 (Zorraquino *et al.*, 2007).

Respecto a los antibióticos utilizados para el tratamiento de otras patologías del ganado vacuno diferentes a la mastitis, Zorraquino (2008) señalan que las frecuencias más importantes se deben a la metritis (22,7%), infecciones podales (15,5%), neumonías (15,3%) y heridas postquirúrgicas (9,5%) principalmente, según Tabla 2.

Entre los diferentes antibióticos empleados (Tabla 2), se destacan la penicilina para el tratamiento de metritis (23,0%) y heridas postquirúrgicas (65%); oxitetraciclina para la metritis (37,0%) y neumonías (28,4%); ceftiofiur en caso de metritis (27,0%) e infecciones podales (22,0%); cefalexina (29,3%) y tilosina (20,7%) para el tratamiento de las infecciones podales y enrofloxacina (23,3%) para otras infecciones del ganado.

A modo de síntesis, se puede establecer haciendo uso de las Figuras 2, 3, 4, 5 y la Tabla 2. que los antibióticos más utilizados en los medicamentos para diferentes tipos de tratamientos del ganado vacuno en España son penicilinas (penicilina, cloxacilina, amoxicilina, ampicilina), cefalosporinas (cefalexina, cefquinoma, cefalonio, cefapirina), aminoglucósidos (neomicina, gentamicina, kanamicina y estreptomina, aunque este último se emplea combinado con penicilina), quinolonas (enrofloxacina), tetraciclinas (oxitetraciclina) y en menor medida espiramicina y lincomicina.

Tabla 2. Antibióticos utilizados en el tratamiento de patologías del ganado vacuno diferentes a la mastitis en España

Antibióticos	Metritis (22,7%)	Infecciones Podales (15,5 %)	Neumonias (15,3 %)	Heridas postquirúrgicas (9,5 %)	Otras Infecciones (10,3 %)
Oxitetraciclina	37,0 %	10,0 %	28,4 %	15,2 %	2,8 %
Penicilina	23,0 %	9,2 %	8,5 %	65,0 %	6,6 %
Ceftiofur	27,0 %	22,0 %	15,6 %	8,0 %	2,3 %
Cefapirina	14,0 %	-	-	-	-
Cefquinoma	2,9 %	-	3,5 %	-	-
Cefalexina	-	29,3 %	6,5 %	6,2 %	-
Tilosina	-	20,7 %	2,4 %	-	-
Enrofloxacina	-	-	4,2 %	6,0 %	23,3 %
Amoxicilina	-	-	9,1 %	-	3,6 %
Ampicilina	-	-	-	-	4,0 %
Marbofloxacina	-	-	8,5 %	-	4, %
Sulfamidas/TMP	-	-	-	-	24,3 %
Gentamicina	-	-	3,7 %	-	10,3 %
Colistina	-	-	2,4 %	-	8,9 %

Fuente: Zorraquino (2008). Relevamiento de 2.747 explotaciones ganaderas de España (118.775 vacas lecheras, 12% del censo español).

Se debe destacar que en Argentina, no existen datos de frecuencias de las diversas patologías del ganado vacuno productor de leche, así como tampoco se dispone de datos sobre los antibióticos utilizados para cada enfermedad. Una encuesta realizada por Tarabla y Calvinho (2008) a 74 veterinarios en la Estación Experimental Agropecuaria Rafaela (INTA) señala que un 70,7% de los profesionales tenía en cuenta su experiencia clínica para la elección del antibiótico y un 41,4% utilizaban antibiogramas. Entre los criterios más utilizados para seleccionar las vacas a tratar se destacan la historia de mastitis clínicas (53,4%), los conteos de células somáticas individuales (43,3%), los resultados del antibiograma (30%), la producción individual de leche (26,7%) y la prueba de mastitis de California (13,3%). Los autores advierten una importante difusión en el uso de la terapia para vaca seca y el cultivo de muestras de leche en los tambos asesorados.

II.3.2. Origen de la contaminación en la explotación lechera

La contaminación de la leche cruda con residuos de Medicamentos Veterinarios (RMV), especialmente antibióticos, se origina en el tambo, como consecuencia de los tratamientos terapéuticos veterinarios que se aplican a las vacas lecheras en lactación y al incumplimiento de los períodos de seguridad de los medicamentos.

Los tratamientos en el tambo que más RMV aportan a la leche cruda son los aplicados por vía intramamaria. Dichos tratamientos consiguen una mayor eficacia terapéutica por su acción local, pero presentan la desventaja de producir una mayor excreción del antibiótico en la leche.

La contaminación de la leche con RMV tiene como característica la de propagarse a gran escala o grandes volúmenes. Es decir, la leche contaminada que procede de una sola vaca tratada puede dar lugar a la contaminación de silos de almacenamiento de más de 100.000 litros. Todo esto se debe a su característica líquida, a su forma de recolección y de acumulación en grandes volúmenes.

Esto se agrava porque algunos Límites Máximos de ciertos antibióticos en la leche son extremadamente bajos como ocurre con la penicilina, ampicilina, amoxicilina, que presentan un LMR de 4 µg/l.

Pese al efecto dilución de la leche, ya que se recolecta y almacenada en grandes silos, no logra una disminución en su concentración final del antibiótico por debajo de su LMR. Con lo cual, el efecto “beneficioso” que podría resultar de la dilución se torna “altamente perjudicial” desde el punto de vista de la seguridad alimentaria.

Como consecuencia de este hecho, los puntos de control para evitar esta “contaminación en gran escala” coinciden con los momentos en los que se producen las diferentes “diluciones”, es decir, los puntos a controlar deben ser:

- a. el ordeño de la vaca tratada en el tambo,
- b. la recolección de la leche del tanque,
- c. la recepción de cisternas en la planchada de la industria,
- d. el movimiento de la leche dentro de la industria que se realiza en los silos.

II.4. ASPECTOS LEGALES

Un requisito previo a la autorización de la administración de productos veterinarios a animales destinados a la producción de alimentos, es la fijación de los Límites Máximos de Residuos (LMRs) correspondientes a los distintos principios activos. Para fijar los LMRs, los laboratorios farmacéuticos deben presentar al organismo fiscalizador correspondiente, como por ejemplo la Agencia Europea del Medicamento (Europa) o el Servicio Nacional de Sanidad Animal (Argentina), amplios análisis de evaluación toxicológica, referidos a su toxicidad, mutagenicidad, cancerigenicidad, teratogenicidad, fetotoxicidad, embriotoxicidad y ecotoxicidad.

Los LMRs se establecen atendiendo a la concentración sin efectos observables en animales de laboratorio, y al cálculo de la Ingesta Diaria Admisible o aceptable daily intake (IDA o ADI), a la que se añade un factor de seguridad.

El valor IDA indica la cantidad de residuos que una persona puede ingerir con la alimentación diariamente durante toda su vida sin sufrir daño. Para fijar los LMRs se presuponen unas cantidades diarias pre-definidas de consumo de alimentos de origen animal, y con las mismas se configura la llamada “canasta de alimentos” (“food basket”). En la “canasta de alimentos” de la UE se considera un consumo diario de leche y productos lácteos de 1,5 litros/día.

Pero sólo desde hace algunos años se incluye también en el catálogo de requisitos para la evaluación toxicológica de las sustancias farmacológicamente activas, la influencia de los residuos de antibióticos (antimicrobianos) en la leche sobre los microorganismos empleados tecnológicamente. Es decir, en el caso de los principios activos para los que el LMR fue fijado anteriormente a esa fecha no se ha tenido en cuenta el “límite tecnológico de anomalía”, motivo por el cual la presencia de residuos antibióticos en la leche a concentraciones máximas permitidas (LMR) podía seguir ocasionando problemas en la fabricación de yogurt y otros productos fermentados.

Para saber si el respeto de los LMRs garantiza también la seguridad tecnológica en la industria láctea, se han realizado ensayos en modelo laboratorio con cultivos de iniciadores mesófilos y termófilos disponibles en el mercado (para la fermentación de yogures y quesos) y se ensayaron algunos antibióticos en la leche a niveles del LMR. Se detectaron diferencias significativas entre los resultados obtenidos con leche que contenía antibióticos a niveles del LMR respecto a la leche sin antibióticos.

De estos trabajos, se puede concluir que algunos residuos de Medicamentos Veterinarios siguen produciendo problemas tecnológicos en la fabricación del yogurt y quesos aún cuando se encuentren en la leche a niveles de los LMRs, es decir, la fijación de los LMRs no garantiza los problemas de tipo tecnológicos debido a estos residuos.

II.4.1. Límite Máximo de Residuo

Para controlar la presencia de residuos de medicamentos en los alimentos, las diferentes legislaciones, como el Codex Alimentarius, la Unión Europea y en el 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. 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 de este reglamento incluye aquellas sustancias cuyos LMR se han establecidos para uno o más productos animales y en el Anexo II se encuentran aquellas sustancias para las cuales no es necesario establecer su LMR porque se consideran seguras. El Anexo III contempla las sustancias que tienen un LMR provisional (MRLP), pendientes 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, tales como cloranfenicol, nitrofuranos, etc. Estas sustancias están terminantemente prohibidas para uso en animales de producción.

En dicha reglamentación se define al Límite Máximo de Residuo (LMR) de Residuos 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 Argentina, por medio del DECRETO 815/1999 (SENASA, 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, 2001), ampliado con normas del MERCOSUR y del CODEX (CODEX 1996, 2007), a través de sus artículos 555, 556, 556 bis del Capítulo VIII. En el artículo 556 del Código Alimentario Argentino, se describen los valores de 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 de Argentina, por medio de la Resolución N° 256/2003 (SENASA, 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.

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).

En la Tabla 3 se indican los LMRs establecidos por la Legislación Europea, los niveles fijados por el CODEX y las tolerancias de USA para sustancias quimioterapéuticas y antibióticos utilizados en ganado lechero. Los Límites Máximos Admitidos por el Código Alimentario Argentino, no se señalan puesto que coinciden con los LMR establecidos por el CODEX.

II.4.2. Tiempo de espera o período de seguridad de los animales tratados

La contaminación de la leche con Residuos de Medicamentos Veterinarios tiene lugar cuando no es respetado el período de seguridad de los medicamentos autorizados. Es el período pos-tratamiento durante el cual la leche contiene RMV en concentraciones superiores al Límite Máximo Permitido, normalmente expresado en número de ordeños. El productor lechero debe respetar estos períodos de supresión o retirada de la leche destinada para su consumo humano o animal.

La autorización para su comercialización y uso cuando abarca un nivel de toda la UE, se obtiene de la Agencia Europea del Medicamento (EMA) o localmente por las Agencias del Medicamento de cada país. En EEUU el organismo competente es la FDA (Food and Drug Administration) en su organismo CVM.

El **tiempo de espera de medicamentos veterinarios** se fija en la UE cuándo la concentración del principio activo en la leche de los animales de ensayo sanos es inferior a la correspondiente concentración LMR.

Tabla 3. Límites máximos de residuos (LMRs) establecidos por el Codex Alimentarius, Unión Europea y niveles de tolerancia (SL/tolerance) en USA de antibióticos 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
Tretraciclina		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
Espectinomicina		200	
DH/Estreptomicina	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).

Además, se tiene en cuenta un margen de seguridad adicional. Dado que por regla general no se consume leche de un solo animal, sino una mezcla procedente de un mayor o menor número de centros de producción, la fijación de los LMRs en el nivel de animales concretos se traduce para el consumidor, por lo general, en un gran margen de seguridad.

Para la aplicación de los **LMRs a los diferentes niveles de la cadena alimentaria**, enmarcado en la gestión de riesgos, la Federación Internacional de Lechería (FIL-IDF) ha propuesto las siguientes interpretaciones de aplicación a los diferentes niveles de la cadena:

- leche de vaca individual o glándula mamaria: respeto del tiempo de espera
- depósito - tanque almacenamiento en la explotación ganadera: verificación de las buenas prácticas ganaderas
- cisterna - vehículo de recogida: idoneidad para el ulterior procesamiento tecnológico
- leche para el consumo: Seguridad Alimentaria.

II.5. CONTROL DE RESIDUOS DE MEDICAMENTOS EN EL TAMBO

En el año 1997, la FDA inicia un sistema de control de alimentos que se basa en la implementación de un Análisis de Riesgos y Control de Puntos Críticos (HACCP) para productos pesqueros que persiguió como objetivo la ausencia de todo tipo de contaminación a lo largo de todo el proceso de elaboración. Los siguientes puntos críticos de este sistema se esquematizan en la Tabla 4.

Como consecuencia de ello, se comenzó a aplicar en Estados Unidos un programa de aseguramiento de la calidad lechera. Para ello, la Asociación Veterinaria

Americana y la Federación de Productores de Leche aplicaron el concepto de HACCP y elaboraron un protocolo que debe seguirse por los establecimientos tamberos con el fin de mejorar las prácticas terapéuticas, evitando la presencia de residuos de medicamentos en leche y sus subproductos.

Tabla 4. Análisis de Riesgos y Control de Puntos Críticos propuesto por FDA (1997)

Punto Crítico	Etapa
1	Identificación de riesgos potenciales.
2	Determinación de puntos críticos de control.
3	Establecimiento de límites críticos.
4	Instalación de sistemas de monitorización
5	Generación de acción correctiva cuando los límites son sobrepasados.
6	Llevado de registros.
7	Verificación periódica del sistema para asegurar su funcionamiento.

Posteriormente, basado en la propuesta anterior, Heeschen (1996) expone un esquema para el control de residuos de antibióticos en la leche. En dicho esquema se propone la aplicación del Sistema de Control de Puntos Críticos (HPCCP), para evitar la presencia de residuos en la leche, que se resume en la Tabla 5.

Los 10 puntos críticos del programa consideran la necesidad de establecer una serie de medidas preventivas en especial para el caso de la mastitis, por lo que es interesante establecer en el ámbito de la explotación ganadera un programa higiénico sanitario de los animales en lactación y una buena profilaxis durante el secado.

Este programa plantea la importancia de emplear medicamentos seguros de acuerdo a las condiciones que indica la legislación, e implementar el uso de métodos de detección de residuos para aquellos animales tratados antes de volver al ordeño normal. Dicho programa debe contribuir a la mejora de la situación sanitaria de la explotación y

en consecuencia, a una disminución de los tratamientos con aquellos medicamentos veterinarios susceptibles de generar residuos.

Tabla 5. Programa para la prevención de residuos de medicamentos en leche

Puntos Críticos	Concepto
1	Implantar medidas sanitarias preventivas, especialmente para el control de la mastitis.
2	Establecer una relación válida entre el veterinario-cliente-paciente.
3	Emplear únicamente medicamentos seguros, es decir, revisados y/o aprobados por la comisión Nacional o Europea, frente a los nuevos límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en alimentos establecidos en Europa.
4	Comprobar que todos los medicamentos tienen etiquetados acordes con el R.D. 109/95 del 25 de enero de 1995.
5	Utilizar todos los medicamentos susceptibles de producir residuos bajo receta veterinaria, siguiendo estrictamente las indicaciones referentes a vía de admisión, dosis y períodos de espera.
6	Almacenar en lugar apropiado todos los medicamentos.
7	Registrar los tratamientos, e identificar todos los animales tratados.
8	Implantar el uso de métodos de detección de residuos en las vacas antes de que vuelvan al ordeño, especialmente cuando se utilizan los medicamentos de forma fuera-de-etiquetaje.
9	Concienciar a los empleados en el uso adecuado de los medicamentos y registro de los tratamientos.
10	Hacer una revisión anual de este programa, añadiendo nuevas medidas si fuera necesario.

Fuente: Zorraquino (1996).

A modo de síntesis, se puede establecer que a nivel de un tambo, junto con la aplicación de un adecuado manual de Buenas Prácticas Ganaderas en el Uso de Medicamentos Veterinarios, se debe considerar además:

- ✓ Utilizar productos autorizados (SENASA) para su uso en ganado vacuno lactante, en las dosis y vías de administración prescritas
- ✓ Respetar los períodos de retiro indicados en el informe de aprobación o prospecto.
- ✓ Utilizar métodos de screening de residuos de antibióticos diseñados especialmente para su uso en el tambo.

El ordeño de la vaca en tratamiento constituye el primer punto crítico de la cadena de contaminación en la cadena alimentaria. El tambero y el Médico Veterinario se encuentran a menudo en situaciones de compromiso o duda respecto la posibilidad que la leche recién ordeñada contenga residuos de Medicamentos Veterinarios. Por este motivo, la utilización de métodos de screening para la detección de residuos en el propio tambo, le permite verificar su sistema de control y evitar de este modo una posterior contaminación en la cadena alimentaria.

La utilización de métodos adecuados para la detección de antibióticos al pie de la vaca en ordeño, constituyen una herramienta que puede evitar un gran número de contaminaciones debidas a fallos en el control rutinario.

Por todo ello, en un primer nivel, es decir, en el propio tambo, es necesario que el productor (o veterinario de campo) incluya entre las medidas de control apropiadas, la realización de tests de inhibidores que le permitan asegurar la ausencia de residuos de sustancias antibacterianas en la leche que entrega y poder de este modo verificar la eficacia de sus medidas de control. De este modo, evitará la aplicación de sanciones, y conservará la inocuidad de la leche desde la salida del tambo.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

En este trabajo se llevaron a cabo dos experimentos, el primero consiste en una evaluación del sistema Resscreen[®] sin predifusión en su presentación de microtubos fraccionables para ser utilizado con leche procedente de animales individuales, y el segundo comprende su aplicación en el tambo para el estudio de los tiempo de espera de los animales luego de haberse tratado con antibióticos según diferentes patologías.

El primer experimento (*in vitro*) se llevó a cabo en las instalaciones de la cátedra de Biofísica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral de Esperanza (Santa Fe), mientras que el segundo experimento (*in vivo*) se realizó en el establecimiento La Matuza SRL, del Distrito Cululú, perteneciente al Departamento Las Colonias de la Provincia de Santa Fe.

A continuación, se detallan los diseños experimentales que se implementaron en los dos trabajos, para alcanzar los objetivos específicos propuestos. De igual forma, se detallan los materiales utilizados en cada uno de ellos.

III.1. EXPERIMENTO 1. PROPIEDADES DEL MÉTODO RESSCREEN[®]

III.1.1. Sistema Resscreen[®]

El sistema ResScreen[®] consta de bioensayos BT (betalactámicos y tetraciclinas) y bioensayo BS (betalactámicos y sulfamidas). La combinación de dos bioensayos ha sido optimizada para la detección e identificación de residuos de antibióticos betalactámicos (Nagel *et al.*, 2009a), tetraciclinas (Nagel *et al.*, 2009b) 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 (Nagel *et al.*, 2011).

El principio del método se basa en la inhibición del crecimiento de *Geobacillus 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 bioensayos 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 desee investigar la naturaleza del antibiótico presente en una muestra de leche incógnita, se procederá al análisis de dicha muestra mediante ambos bioensayos, la interpretación se efectúa según la Tabla 6 (Nagel, 2009).

Tabla 6. 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 contienen residuos de betalactámicos producirán resultados positivos en ambos bioensayos, las muestras que contengan residuos de Tetraciclinas 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. Por el contrario, en caso que las muestras de leche estén libres de residuos, se producirá el desarrollo del microorganismo en los dos microtubos (resultados negativos).

Cuando el método se utiliza en un tambo, donde se conoce la naturaleza del fármaco que se administra al animal, se procede a utilizar el bioensayo correspondiente según el antibiótico utilizado. Es decir, si el animal se trata con betalactámicos o tetraciclinas se emplea el bioensayo BT, en caso de utilizarse betalactámicos o sulfamidas, la leche se debe analizar con el bioensayo BS, mientras que los tratamientos con tilosina, neomicina o lincomicina pueden controlarse en la leche con cualquiera de los dos métodos en forma indistinta.

Para el análisis de muestras de leche mediante este método, se agregó un volumen de 50 µl de leche en cada tubo individual del rack fraccionable de bioensayo BT y/o bioensayo BS, según corresponda. A continuación, los tubos se sellaron con banda adhesiva provistas para tal fin y se incubaron en un baño de agua a 64 ± 1 °C durante 2,5 horas (bioensayo BT) y 3,5 horas (bioensayo BS), según las instrucciones del fabricante.

III.1.2. Método de referencia Delvotest[®] MCS

Además, en el presente trabajo se empleó el método de inhibición microbiológica Delvotest[®] MCS, que contiene los nutrientes incorporados en el medio agarizado y permite detectar un amplio espectro de antibióticos. El método utiliza púrpura de bromocresol como indicador de pH. Se trata del método más difundido a nivel mundial, considerándose como un método sencillo, fiable, económico y de una amplia vida útil (Beukers, 1991), con buena sensibilidad para detectar residuos de antibióticos betalactámicos (Charm y Ruth, 1993) y media para tetraciclinas (Van Os y Beukers, 1980) y sulfonamidas (Charm y Ruth, 1993). Debido a que es considerado un

método seguro y exacto por la AOAC (Kelly, 1982; AOAC, 2000), se lo utilizó como método de referencia.

El método se llevó a cabo conforme a las instrucciones de la casa fabricante. Para ello, 100 µl de cada muestra de leche se agregó a pocillos individuales de Delvotest[®] que contienen esporas de *Gb. stearothermophilus* var. *calidolactis* e indicador en el medio agarizado. Una vez llena, las placas se sellaron con banda adhesiva suministrada. Las placas se incuban en un baño de agua a 64±1 °C durante 3 horas, según las recomendaciones de la casa fabricante.

III.1.3. Estudio de especificidad

Para el análisis de la especificidad se utilizaron muestras de leche procedentes de 192 animales que no fueron medicamentados ni recibieron alimentación con fármacos (FIL- IDF, 2002). Los animales provenían de una explotación ganadera productora de leche La Matuza SRL, del Distrito Cululú, perteneciente al Departamento Las Colonias de la Provincia de Santa Fe del Departamento Las Colonias (Santa Fe, Argentina).

Las muestras de leche presentaban una composición química y valores de pH, considerados normales para leche de vacuna en Argentina, así como recuentos de células somáticas (RCS<400000 células/ml) y cantidad bacteriológica (CFU<100000 ufc/ml) adecuados.

Además, las muestras fueron analizadas por duplicado mediante el método Delvotest[®] MCS (DSM Food Specialties, Dairy Ingredients, Delft, The Netherlands) por tratarse de un método reconocido por Association of Official Analytical Chemists (Kelley, 1982).

La especificidad para los bioensayos BT, BS y Delvotest[®] MCS se calculó como la frecuencia relativa porcentual de resultados negativos, haciendo uso de la siguiente expresión:

“Especificidad” = "(resultados negativos/muestras totales analizadas)*100".

III.1.4. Estudio de límites de detección

III.1.4.1. Disoluciones de fármacos y muestras fortificadas

Para el cálculo de los límites de detección de los diferentes bioensayos, se utilizaron 24 agentes antimicrobianos (10 betalactámicos, 6 tetraciclinas, 5 sulfonamidas, además de tilosina, neomicina y lincomicina) por tratarse de fármacos que son detectados por *Gb. stearothermophilus* (Nagel, 2009) se detallan en la Tabla 7.

En el estudio de los límites 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, 0.0100 g 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 7).

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 elaboradas anteriormente (100, 10 y 1 mg/l, “stock”), siguiendo las recomendaciones de la FIL-IDF (FIL-IDF, 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 7. 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
Cefoperazona	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>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
Doxiciclina	H ₂ O	Sigma	D-9891	C ₂₂ H ₂₅ ClN ₂ O ₈
Meclociclina	H ₂ O	Sigma	M-1388	C ₂₂ H ₂₁ ClN ₂ O ₈ .C ₇ H ₆ O ₆ S
Oxitetraciclina	HCl 0,1 N	Sigma	O-5750	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₉ .HCL
Rolitetraciclina	H ₂ O	Sigma	R-2253	C ₂₇ H ₃₃ N ₃ O ₈
Tetraciclina	HCl 0,1 N	Sigma	T-3258	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈ .HCl
<i>Otros</i>				
<i>antibióticos</i>				
Neomicina	Fosfato pH=8	Sigma	N-1876	C ₂₃ H ₄₆ N ₆ O ₁₃ .3H ₂ SO ₄
Lincomicina	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

^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 no tratados con medicamentos durante el experimento (FIL-IDF, 1997, 2002). De cada uno de los fármacos, se prepararon 12 disoluciones (1 blanco de muestra de leche sin la adición de antibiótico y 11 concentraciones de los antibióticos estudiados). Las concentraciones empleadas variaron para los diferentes bioensayos y se detallan en Tabla 8, Tabla 9 y Tabla 10.

Tabla 8. Concentraciones de antibióticos betalactámicos utilizados para el cálculo de los límites de detección del sistema ResScreen[®]

Antibiótico	Concentraciones (µg/l)
<i>Betalactámicos</i>	
Amoxicilina	0; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 12; 14
Ampicilina	0; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 12; 14
Cloxacilina	0; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 45; 50; 60; 70
Oxacilina	0; 4; 6; 8; 10; 12; 14; 16; 18; 20; 22; 25
Penicilina “G”	0; 1; 1.5; 2; 2.5; 3; 3.5; 4; 4.5; 5; 6; 8
Cefadroxilo	0; 20; 40; 60; 80; 100; 120; 140; 160; 180; 200; 250
Cefalexina	0; 20; 40; 60; 80; 100; 120; 140; 160; 180; 200; 250
Cefoperazona	0; 20; 40; 60; 80; 100; 120; 140; 160; 180; 200; 250
Ceftiofur [®]	0; 20; 40; 60; 80; 100; 120; 140; 160; 180; 200; 250
Cefuroxime	0; 20; 40; 60; 80; 100; 120; 140; 160; 180; 200; 250

III.1.4.2. Límites de detección del método Rescreen[®] “BT” y “BS”

Para el estudio de los límites de detección de cada agente antimicrobiano, se emplearon dos microplacas del método Rescreen[®] “BT” y Rescreen[®] “BS” y se efectuaron 16 réplicas de 12 disoluciones de leche.

En cada pocillo de la microplaca, se depositó 50 µl de disolución de leche previamente enriquecida con el antibiótico a estudiar. Seguidamente, las microplacas de ambos métodos se sellaron con bandas adhesivas y se colocaron a incubar en baño

flotante de agua a temperatura de 64 ± 1 °C durante un tiempo de 2,5 horas (bionsayo BT) y 3,5 horas (bioensayo BS).

Tabla 9. Concentraciones de tetraciclinas y sulfamidas utilizadas para el cálculo de los límites de detección del sistema Resscreen[®]

Bioensayo	Antimicrobiano	Concentraciones ($\mu\text{g/l}$ o $^*\text{mg/l}$)
Bioensayo BT	<i>Tetraciclinas</i>	
	Doxicilina	0; 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90; 100; 120
	Meclociclina	0; 10; 20; 30; 40; 60; 80; 100; 120; 140; 160; 180
	Clortetraciclina	0; 25; 50; 75; 100; 125; 150; 175; 200; 300; 400; 500
	Oxitetraciclina	0; 25; 50; 75; 100; 125; 150; 175; 200; 225; 250; 300
	Rolitetraciclina	0; 25; 50; 75; 100; 125; 150; 175; 200; 225; 250; 300
	Tetraciclina	0; 25; 50; 75; 100; 125; 150; 175; 200; 225; 250; 300
	<i>Sulfamidas</i>	
	Sulfadiazina	0; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 45; 50; 60; 80*
	Sulfadimetoxina	0; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 12; 14; 16; 18; 20*
	Sulfametazina	0; 5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 45; 50; 60*
	Sulfametoxazol	0; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 10; 12; 15*
	Sulfatiazol	0; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 10; 12; 15*
Bioensayo BS	<i>Tetraciclinas</i>	
	Doxiciclina	0; 20; 40; 60; 80; 100; 120; 140; 160; 180; 200; 220
	Meclociclina	0; 20; 40; 60; 80; 100; 120; 140; 160; 180; 200; 220
	Clortetraciclina	0; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5; 5; 5,5; 6*
	Oxitetraciclina	0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 1; 1,2; 1,4*
	Rolitetraciclina	0; 200; 300; 400; 450; 500; 550; 600; 650; 700; 750; 800
	Tetraciclina	0; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1; 1,2; 1,5*
	<i>Sulfamidas</i>	
	Sulfadiazina	0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,4; 1,6*
	Sulfadimetoxina	0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,5; 1,8*
	Sulfametazina	0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,4; 1,6*
	Sulfametoxazol	0; 0,1; 0,15; 0,2; 0,25; 0,3; 0,35; 0,4; 0,5; 0,6; 0,8; 1*
	Sulfatiazol	0; 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,25; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,8; 1*

Tabla 10. Concentraciones de otros agentes antimicrobianos utilizados para el cálculo de los límites del sistema Resscreen[®]

Antimicrobiano	Concentraciones ($\mu\text{g/l}$ o $^*\text{mg/l}$)
Neomicina	0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,4; 1,6; 1,8; 2,0; 3,0*
Lincomicina	0; 25; 50; 75; 100; 125; 150; 175; 200; 225; 250; 300
Tilosina	0; 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 100; 120; 140; 160

III.1.4.3. Interpretación de los resultados

Los residuos de antibióticos presentes en las muestras de leche, reducen o inhiben el desarrollo microbiano y por lo tanto la actividad fermentativa de la bacteria-test. Por ello, tanto los procesos de acidificación debido a su actividad metabólica, como los procesos oxidativos, se ven disminuidos, acompañados de la persistencia del color original del indicador presente en el método. Por el contrario, cuando la leche está libre de residuos de antibióticos, tienen lugar los procesos metabólicos, acompañados de la producción de ácido y de la capacidad oxidativa de la bacteria-test. En tal situación, se producen cambios en los valores de pH y/o potencial redox del medio de cultivo, acompañado de cambios en la coloración de los indicadores ácido-base o redox, según corresponda.

Las interpretaciones visuales de los bioensayos BT y BS se llevaron a cabo por tres personas calificadas y entrenadas para lecturas de variables dicotómicas en términos de “negativo” (viraje del color original del indicador) o “positivo” (conservación del color original del indicador). Las calificaciones dudosas (colores intermedios) fueron consideradas como “positivas” al método (Suhren *et al.*, 1996). La Tabla 11 resume los diversos indicadores ácidos-bases, redox o sus combinaciones y los colores que presentan cada bioensayo clasificados según la respuesta (“positivo” o “negativo”).

Tabla 11. Indicadores y colores del sistema Resscreen[®] clasificados según sus respuestas

Bioensayo	Tipo indicador	Indicadores	Color	
			Negativo	Positivo
Bioensayo BT	Ácido-Base	PBC	Amarillo	Púrpura
Bioensayo BS	Redox	NB-AT	Amarillo	Negro

PBC: púrpura de bromocresol, NB: negro brillante, AT: azul de toluidina.

III.1.4.4. Análisis estadístico de los resultados

Las curvas dosis-respuesta para cada antibiótico se ajustaron mediante el siguiente modelo de regresión logístico:

$$L_{ij} = \text{logit} [P_{ij}] = \beta_0 + \beta_i [A]_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde: L_{ij} = modelo logístico; $[P_{ij}] = \text{logit} [P_p/(1-P_p)]$: 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.

III.1.4.5. Cálculo de los límites de detección del método *Resscreen*[®]

Los límites de detección (LDs) de cada antibiótico se calcularon como la concentración de antibiótico que produce un 95% de resultados positivos en la curva dosis-respuesta construida con datos dicotómicos (Suhren y Heeschen 1993; Reichmuth *et al.*, 1997; Suhren *et al.*, 1997; Sternesjo y Johsson, 1998; FIL-IDF, 1997, 2002; Althaus *et al.*, 2002).

Para ello, se utilizó el modelo de regresión logístico del paquete estadístico Statgraphics[®] Centurion XV (Statgraphics, 2008). Además, para cada fármaco se calculó el coeficiente de concordancia como un parámetro que indica el ajuste logrado entre las frecuencias reales de las curvas dosis-respuestas y las frecuencias estimadas por el modelo logístico, lo que se detalla en el apartado de análisis estadístico.

III.2. EXPERIMENTO 2: UTILIZACIÓN DEL MÉTODO RESSCREEN EN TAMBO PARA LA DETERMINACIÓN DEL PERIODO DE RETIRO DE ANIMALES TRATADOS.

III.2.1. Animales y toma de muestra de leche

Las muestras de leche se recolectaron de vacas disponibles en el establecimiento productivo La Matuza SRL (Cululú, departamento Las Colonias, provincia de Santa Fe) ubicado a los 31° 28' de latitud sur, y 60 ° 55 'de longitud oeste, siendo el clima de la región semihúmedo - húmedo, según la clasificación de Thournthwaite, con precipitaciones anuales que oscilan entre los 652 y 1272 mm anuales, se registran temperaturas medias comprendidas entre los 17 °C y 19 °C, siendo los valores extremos de 6 °C en invierno y 40 °C en verano.

Los animales fueron alimentados con pastura implantada de base alfalfa y suplementada por medio de una mezcla con Mixer usando silo de maíz, grano de maíz molido, expeller de girasol y semilla de algodón, a lo largo de toda la experiencia, la cual se llevó a cabo entre los meses de septiembre y noviembre.

Dicho establecimiento contenía 464 vacas de la raza Holando-Argentino que se encontraban en estado de lactación con un promedio individual de 26 litros diarios en dos ordeños.

Las muestras de leche se tomaron de animales según la técnica de rutina de ordeño clásica. Para ello, se realiza el despunte o prueba de los primeros chorros, luego pre-deepen colocación de la garra, seguida de una extracción de la finalización del ordeño y sellado con iodo especialmente indicado para tal fin.

El ordeño se organizó según cinco lotes de animales:

- *Lote A* constituido por vacas recién paridas que incluyen animales de finales del calostrado hasta los 60-70 días post parto.
- *Lote B* formado por animales de alta producción.
- *Lote C* conformado por las vaquillonas de primer parto que se mantienen en este lote hasta finalizar su primera lactancia.
- *Lote D* (o también denominado lote de cola) formado por vacas de baja producción, preñadas.
- *Lote E* animales de enfermería, que incluye a aquellas vacas con diversos problemas clínicos, tales como mastitis, retención de placenta, problemas podales, problemas digestivos, etc. La leche procedente de animales tratados o con residuos de antibióticos no se comercializa. Dentro de este grupo se eligieron 24 animales que se clasificaron en cuatro grupos de 6 vacas cada uno según las siguientes patologías:
 - *I. Mastitis clínica.* Las mastitis clínica fue detectada por los operarios durante el ordeño mediante la prueba de los primeros chorros y confirmada luego por el veterinario, quien clasificó a los animales en dos subgrupos según posean mastitis de tipo catarral (en los cuales solamente se encuentra alterada la secreción) y mastitis parenquimatosa (animales que presentan además afectación en el parénquima mamario con proceso inflamatorio). En este caso se formaron dos subgrupos de seis animales cada uno según el tipo de mastitis:
 - *I. B. Animales con mastitis catarral:* fueron tratados con amoxicilina mediante la aplicación del producto comercial Clamoxyl[®] L.A. (Laboratorio Pfizer, Sanidad Ganadera) por medio de la aplicación de

una dosis intramuscular de 50 ml conteniendo 15.3 g/100 ml de amoxicilina trihidrato.

- *I. A. Animales con mastitis parenquimatosa:* se trataron con una combinación de sulfamida y trimetoprim administrando el quimioterápico inyectable Raxidal[®] (Laboratorio Intervet Shering Plough) mediante la aplicación de una dosis intramuscular de 25 ml que contiene 200 g/100 ml de sulfadoxina y 40 g/100 ml de trimetoprim.

- *II. Animales con enfermedades podales (rengueras o manqueras):* Se observaban los animales que presentaban claudicación de segundo grado ya sea del miembro anterior o posterior, a la inspección en particular presentaban deformaciones inflamatorias por encima de rodete coronario y a la palpación se detectaba calor y sensibilidad aumentada. De esta forma primaria fueron clasificados los animales según las patologías podales por los encargados del ordeño y confirmadas por el veterinario. A un grupo de seis animales se les suministró el tratamiento correspondiente mediante la aplicación de una dosis por vía intramuscular profunda de 30 ml del fármaco comercial inyectable Tylan[®] 200 (Laboratorio Elanco) que contiene 200 mg/ml de tilosina base.

- *III. Retención de placenta (vacas sucias):* endometritis puerperales o metritis. Se trabajó con aquellos animales que transcurridas las 12 a 24 h del parto no habían eliminado las secundinas, manifestaban comienzo de síndrome febril y loquios de características anormales como olor

pútrido. Por ello, estos animales se consideraron vacas con retención de placenta (vacas sucias). A un grupo de seis vacas se les administró un tratamiento con oxitetraciclina mediante aplicación inyectable en forma intramuscular de 25 ml de Terramicina[®] (Laboratorio Pfizer Sanidad Ganadera) que contiene 5 g/100 ml de clorhidrato de oxitetraciclina.

En todos los casos se recolectaron muestras de leche antes de iniciar el tratamiento (controles negativos) y durante los 7 días siguientes con una frecuencia de muestreo de 12 horas (15 muestras por cada animal).

III.2.2. Análisis de muestras de leche

Las muestras de leche procedentes de los ordeños de animales (ordeños de la mañana y de la tarde) fueron recolectadas en recipientes plásticos estériles de un solo uso y sin la adición de conservante, a fin de evitar cualquier tipo de interferencia con los métodos de inhibición microbiológica. Dichas muestras fueron analizadas luego de su recolección, antes de las 2 horas de su obtención.

Para el estudio de la eliminación de residuos de antibióticos, se emplearon los bioensayos BT (betalactámicos-tetraciclinas) y BS (betalactámicos-sulfamidas) y Delvotest[®] MCS por tratarse de un método de referencia reconocido por la AOAC (Kelly, 1982; AOAC, 2000).

De cada muestra de leche, se tomaron alícuotas de 50 µl para los bioensayos BT y BS y 100 µl para el método Delvotest[®] MCS. Los análisis se efectuaron por triplicados de modo tal de obtener al menos dos resultados iguales para cada muestra

analizada. Estos resultados se interpretaron como “positivos” o “negativos” por tres personas entrenadas para la lectura de respuestas colorimétricas de tipo dicotómicas.

III.2.3. Análisis estadístico de los resultados

Por tratarse de una respuesta ordinaria a dos niveles (positivo y negativo) resulta conveniente realizar un tratamiento estadístico mediante el modelo de regresión logística para datos categóricos (Agresti, 1990).

Por ello, los resultados fueron analizados mediante el procedimiento logístico contenido en el paquete estadístico Statgraphics® Centurion XV (Statgraphics, 2008). El modelo de regresión logística empleado para el estudio del efecto del número de ordeños sobre la respuesta de los métodos de inhibición microbiológica fue el siguiente:

$$L_{ij} = \beta_0 + \beta_1 [T]_i + \epsilon_{jj}$$

Donde: L_{ij} = modelo logístico, β_0 = intercepto, β_1 = pendiente del modelo logístico, $[T]_i$ = efecto del número de ordeños y ϵ_{jj} = error residual del modelo.

IV. RESULTADOS y DISCUSIÓN

IV.1. EXPERIMENTO I. PROPIEDADES DEL SISTEMA RESSCREEN®

La validación del sistema Resscreen® consta de dos etapas, en un primer estudio se analizará la especificidad del método y en una segunda fase se calcularán los límites de detección para algunos agentes antimicrobianos empleados en la terapéutica del ganado vacuno productor de leche.

IV.1.1. Estudio de especificidad

Los resultados obtenidos después de analizar triplicados de 192 muestras de leche libres de antibióticos (FIL-IDF, 2002) mediante los bioensayos BT, BS y Delvotest® MCS se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12. Especificidad de los bioensayos BT, BS y Delvotest® MCS

Bioensayo	Número Muestras	Positivo	Negativo	Selectividad (%)
Bioensayo BT	192	2	190	99,0
Bioensayo BS	192	3	189	98,4
Delvotest® MCS	192	1	191	99,5

Especificidad: "resultados negativos/número de muestras".

Los valores de especificidad determinados para los bioensayos BT y BS fueron muy buenos, y similares al calculado para el método de referencia Delvotest® MCS. Se debe mencionar que ambas especificidades (99,0% y 98,4%) fueron próximas a los valores de 98% (Sischo y Burns, 1993) y 95% (Charm y Zomer, 1995) determinados para el método Delvotest® SP y al 99% señalado por Roca *et al.* (2007) para los

métodos Delvotest[®] SP-NT, Eclipse[®] 100 y Eclipse[®] 50, todo ello en muestras de leche de vaca.

Para los bioensayos BT y BS con predifusión, Nagel *et al.* (2009) obtienen especificidades de 97.9 % y 95.8 %, respectivamente. En leche de otras especies, Molina *et al.* (2003) calculan especificidades de 96 % para el método BRT[®] AiM y del 98 % para el método Delvotest[®] SP utilizado con muestras de leche de oveja. Montero *et al.* (2005) al emplear el método Eclipse[®] 100ov con muestras de leche de oveja determinan una especificidad del 99.4 %.

IV.1.2. Estudio de límites de detección

- **Penicilinas:** Los modelos logísticos que expresan las curvas dosis respuestas de los bioensayos BT y BS para las cinco penicilinas ensayadas se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13. Modelos logísticos que expresan los efectos de concentración de antibióticos betalactámicos sobre la frecuencia de resultados positivos al sistema ResScreen[®]

	Betalactámico	Logit $[P_{ijkl}] = \beta_0 + \beta_1 [\text{Beta}]_i$	C
Bioensayo BT	Amoxicilina	Logit [P] = - 12,3260+3,8144*[AMOX]	91.8
	Ampicilina	Logit [P] = - 10,9557+2,2471*[AMP]	85.7
	Cloxacilina	Logit [P] = - 8,3187+0,2890*[CLOX]	88.8
	Oxaciclina	Logit [P] = - 7,5578+0,7144*[OXA]	90.1
	Penicilina "G"	Logit [P] = - 14,8828+6,3391*[PENG]	90.2
Bioensayo BS	Amoxicilina	Logit [P] = -12,7857+3,2283*[AMOX]	90.0
	Ampicilina	Logit [P] = - 11,9338 + 2,51139*[AMP]	87.4
	Cloxacilina	Logit [P] = - 7,5139 + 0,2689*[CLOX]	88.0
	Oxaciclina	Logit [P] = - 8,1519 + 0,7862*[OXA]	90.8
	Penicilina "G"	Logit [P] = -10,7462 + 6,2497*[PENG]	85.6

AMOX: amoxicilina, AMP: ampicilina, CLOX: cloxacilina, OXA: oxaciclina, PENG: penicilina "G", C: Coeficiente de concordancia porcentual.

Para cada bioensayo, Penicilina “G” mostró mayor valor del coeficiente “ β_1 ” seguido por amoxicilina, ampicilina, oxacilina y cloxacilina. Este orden se debe a la mayor sensibilidad que manifiesta *Gb. stearothermophilus* hacia las primeras penicilinas en comparación con las demás y también fue reportado por Althaus *et al.* (1999, 2001), y Molina *et al.* (2003) para el método BRT[®] AiM, Althaus *et al.* (2002, 2003) para el método Delvotest[®] SP y Montero *et al.* (2005) para el método Eclipse[®] 100ov. Además, los coeficientes de concordancia resultaron buenos, al estar comprendidos entre 85,6 % para Penicilina “G” detectada con el bioensayo BS y 91,8 % para la amoxicilina cuando es analizada con el bioensayo BT.

Las curvas dosis respuestas para las cinco penicilinas analizadas con los bioensayos BT y BS se muestran en Figura 6 y Figura 7, respectivamente.

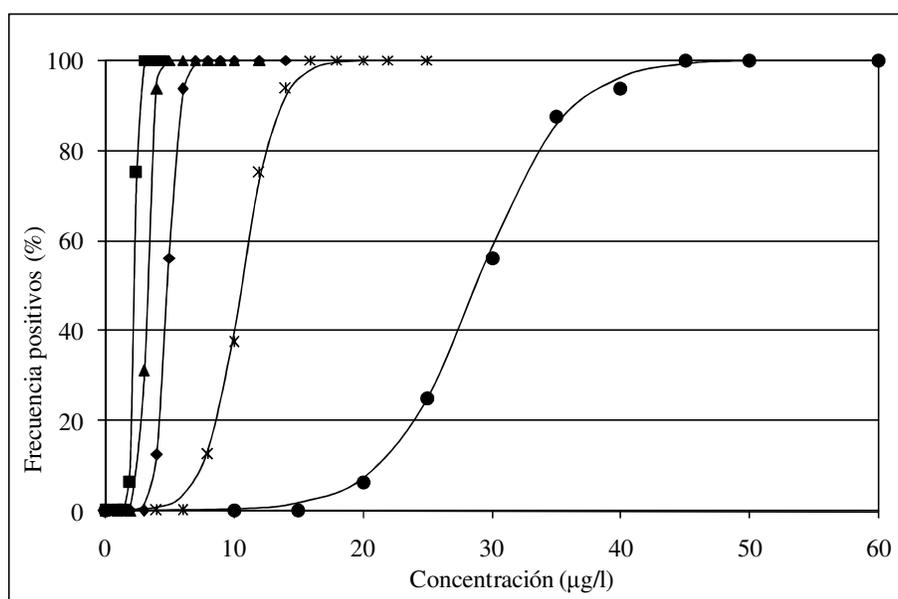


Figura 6. Curvas dosis respuestas de penicilinas en leche analizadas con el bioensayo BT (▲: amoxicilina, ◆: ampicilina, ●: cloxacilina, X: oxacilina, ■: penicilina “G”).

En ambas gráficas se puede visualizar la mayor sensibilidad de los métodos para la detección de Penicilina G, amoxicilina y ampicilina (mayor valores del coeficientes “ β_1 ”) puesto que pequeños incrementos en sus concentraciones (cerca de 4 µg/l)

resultan suficientes para producir el 100 % de resultados positivos a los dos métodos, mientras que la cloxacilina muestra una curva dosis-respuesta más suave que las anteriores.

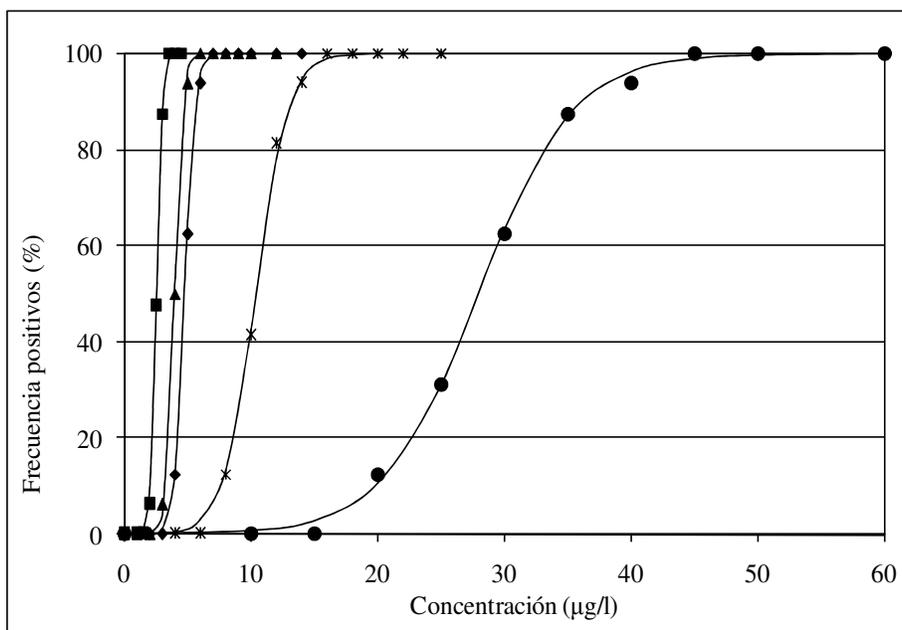


Figura 7. Curvas dosis respuestas de penicilinas en leche analizadas con el bioensayo BS (▲: amoxicilina, ◆: ampicilina, ●: cloxacilina, X: oxacilina, ■: penicilina “G”).

La Tabla 14 resume los límites de detección (LDs) de los bioensayos BT y BS calculados para las cinco penicilinas según el criterio del 95% (FIL-IDF, 2002).

Tabla 14. Límites de detección de penicilinas en leche para el sistema Resscreen®

Penicilinas	Límites de detección del método		LMR
	Bioensayo BT	Bioensayo BS	
Amoxicilina	4,0	4,7	4
Ampicilina	6,2	5,9	4
Cloxacilina	39,0	38,9	30
Oxacilina	14,7	14,1	30
Penicilina “G”	2,8	3,2	4

Cuando se comparan los LDs de cada antibiótico con sus correspondientes LMRs, resulta evidente que el sistema ResScreen[®] permite detectar residuos de las cinco penicilinas (amoxicilina, ampicilina penicilina “G”, oxacilina y cloxacilina) en leche a niveles cercanos a sus respectivos LMRs (<2LMRs).

Los LDs calculados para la amoxicilina mediante los métodos bioensayos BT y BS son similares a los obtenidos por Charm y Ruth (1993) y Zorraquino (1997, 1998) cuando utilizan el método BRT[®] AiM (5 µg/l), aunque Zaadhof *et al.* (1997) informaron un LD para esta penicilina comprendido entre 20 y 30 µg/l, superior al obtenido en este trabajo.

Para el método Delvotest[®] SP, Tramontin *et al.* (1992), Honkanen-Buzalski y Reybroech (1995) y Lacroix (1995) obtienen para la amoxicilina, niveles de detección próximos (4, 6 y 3 µg/l, respectivamente) a los reportados en la Tabla 14. Por el contrario, otros autores (Senyk *et al.*, 1990; Charm y Ruth, 1993; Gardner *et al.*, 1996 y Sischo, 1996) señalan límites de detección comprendidos entre 10 y 18 µg/l.

Los métodos Copan[®] CH-ATK Test y Eclipse[®] 100 presentan límites de detección de amoxicilina levemente inferiores a los determinados en este trabajo (>2LD y >4LD, respectivamente), según los reportes de las casas fabricantes (Roca *et al.*, 2007).

En forma similar, la ampicilina mostró un LD para los métodos bioensayos BT y BS similares a los valores señalados por otros autores (Heeschen, 1993; Heeschen y Blüthgen, 1995; Zorraquino, 1997, 1998) para el método BRT[®] AiM (5 µg/l), aunque Charm y Ruth (1993) reportan un valor de 10 µg/l, levemente superior al presentado en Tabla 14.

Cuando muestras de leche que contienen residuos de ampicilina son analizadas por el método Delvotest[®] SP, Luitz *et al.* (1996) 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; Gardnen *et al.*, 1996 y Sischo, 1996) obtienen para el método Delvotest[®] SP, niveles de detección más elevados (6-10 µg/l) y similares a los determinados en este trabajo para los métodos bioensayos BT y BS. Por su parte, los métodos Copan[®] CH-ATK Test y Eclipse[®] 100 presentan para ampicilina límites de 2-4 y 5 µg/l, respectivamente (Roca *et al.*, 2007).

Con respecto a los residuos de cloxacilina, los límites de detección de los métodos bioensayos BT y BS resultaron similares a su LMR y a los niveles (40-50 µg/l) publicados por diferentes autores (Jaskch, 1988; Heeschen, 1993; Heeschen y Blüthgen, 1995; Zorraquino, 1997 y Analytic in Milch, 1998), sin embargo, para el método BRT[®] AIM, Charm y Ruth (1993) calcularon un valor superior (100 µg/l).

Cuando se emplea el método microbiológico Delvotest[®] SP, cloxacilina es detectada dentro del rango de 20-30 µg/l (Van Os y Beukers, 1980; Honkanen-Buzalski y Reybroech, 1995; Lacroix, 1995; Gardnen *et al.*, 1996 y Luitz *et al.*, 1996). No obstante, otros estudios señalan LDs más cercanos a los valores obtenidos con el sistema sistema ResScreen[®], tales como 35 µg/l (Smink, 1979), 50 µg/l (Charm y Ruth, 1993) y 41-81 µg/l (Senyk *et al.*, 1990).

Los LDs de la penicilina “G” (antibiótico más utilizado en el ganado bovino de leche) calculados para los bioensayos BT y BS resultaron similares a su LMR, no obstante otros autores obtienen niveles inferiores para el método BRT[®] AiM, tales como 1,5 µg/l (Heeschen y Blüthgen, 1995) y los rangos de 1-2 µg/l (Frank, 1995), 2-3 µg/l (Zaadhof *et al.*, 1997) y 2-3 µg/l (Zorraquino, 1997, 1998). Por el contrario Jaskch (1988), Charm y Ruth (1993) y Heeschen (1993) indican valores de LDs de penicilina “G” superiores (6 a 10 µg/l) a los expuestos en Tabla 14.

Cuando se utiliza el método Delvotest[®] SP el LD de la penicilina “G” en leche fue de 3 µg/l y resulta similar (Tramontin *et al.*, 1992; Charm y Ruth, 1993; Honkanen-Buzalski y Reybroech, 1995; Lacroix, 1995; Garnden *et al.*, 1996; Sischo, 1996; Zaadhof *et al.*, 1997) a las 3 µg/l determinados para el sistema ResScreen[®], aunque Smink (1979) obtiene un valor superior (6 µg/l) para residuos de penicilina “G” analizados por Delvotest[®] SP. Los métodos Copan[®] CH-ATK Test y Eclipse[®] 100-50 poseen LDs de 1-2 y 4 µg/l, respectivamente (Roca *et al.*, 2007).

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

Los límites de detección hallados en este trabajo para las cinco penicilinas en leche utilizando el método sin predifusión fueron similares a los calculados por Nagel (2009) para el bioensayo BT ($LD_{AMOX} = 9 \mu\text{g/l}$, $LD_{AMP} = 7 \mu\text{g/l}$, $LD_{CLOX} = 42 \mu\text{g/l}$, $LD_{OXA} = 17 \mu\text{g/l}$, $LD_{PENG} = 3 \mu\text{g/l}$) y bioensayo BS ($LD_{AMOX} = 5 \mu\text{g/l}$, $LD_{AMP} = 4 \mu\text{g/l}$, $LD_{CLOX} = 40 \mu\text{g/l}$, $LD_{OXA} = 16 \mu\text{g/l}$, $LD_{PENG} = 3 \mu\text{g/l}$) con predifusión de una hora antes de la incubación.

- **Cefalosporinas:** La Tabla 15 muestra las ecuaciones logísticas que expresan el efecto de las concentraciones de las cinco cefalosporinas estudiadas sobre las respuestas de los bioensayos BT y BS.

Para ambos métodos, los valores de los coeficientes “ β_1 ” de las cinco cefalosporinas (Tabla 15) resultaron inferiores a los valores obtenidos para las

penicilinas (Tabla 13). Este hecho obedece a que *Gb. stearothermophilus* presenta menor sensibilidad para detectar los residuos de cefalosporinas en leche en comparación con las penicilinas (Althaus *et al.*, 1999, 2001, 2002, 2003; Molina *et al.*, 2003; Montero *et al.*, 2005; Nagel, 2009). Por su parte, los valores de los coeficientes “ β_1 ” son muy similares para las diferentes cefalosporinas contempladas en este estudio.

Tabla 15. Modelos logísticos que expresan los efectos de concentración de Cefalosporinas sobre la frecuencia de resultados positivos al sistema ResScreen[®]

	Cefalosporinas	Logit [P _{ijkl}] = $\beta_0 + \beta_1$ [Cefa] _i	C
Bioensayo BT	Cefadroxil	Logit [P] = - 5,6972 + 0,1816*[CXL]	89,9
	Cefalexina	Logit [P] = - 4,5502 + 0,0670*[CLX]	75,5
	Cefoperazona	Logit [P] = - 7,45006 + 0,1028*[CPZ]	84,4
	Ceftiofur [®]	Logit [P] = - 6,6392 + 0,1042*[CFR]	84,5
	Cefuroxime	Logit [P] = - 6,4120 + 0,1165*[CFU]	86,0
Bioensayo BS	Cefadroxil	Logit [P] = -16.0260 + 0.0970*[CXL]	97,5
	Cefalexina	Logit [P] = - 11,1056 + 0,1110*[CLX]	85,4
	Cefoperazona	Logit [P] = - 10,1702 + 0,1298*[CPZ]	87,7
	Ceftiofur [®]	Logit [P] = - 13,2305 + 0,1404*[CFR]	88,8
	Cefuroxime	Logit [P] = - 16,5661 + 0,1242*[CFU]	88,8

CXL: cefadroxil, CLX: cefalexina, CPZ: cefoperazona, CFR: ceftiofur, CFU: cefuroxime, C: Coeficiente de concordancia porcentual.

Con respecto al ajuste logrado mediante la aplicación del modelo de regresión logístico, se puede establecer que ha sido bueno, puesto que los coeficientes de concordancia porcentuales fueron elevados, al estar comprendidos entre 75,5% para cefalexina (bioensayo BT) y 97,5% para el cefadroxil (bioensayo BS).

Figura 8 y Figura 9 representan los efectos de las concentraciones de cefalosporinas en leche sobre las respuestas de los bioensayos BT y BS, respectivamente. Para el primer método, incrementos en las concentraciones desde 20 $\mu\text{g/l}$ hasta 100 $\mu\text{g/l}$ de cefadroxil, cefuroxime y ceftiofur[®] resultan suficientes para

obtener el 100% de resultados positivos al bioensayo, mientras que cefalexina y cefoperazone deben estar presentes a mayores niveles (120 µg/l) para obtener acusar resultados positivos en el método.

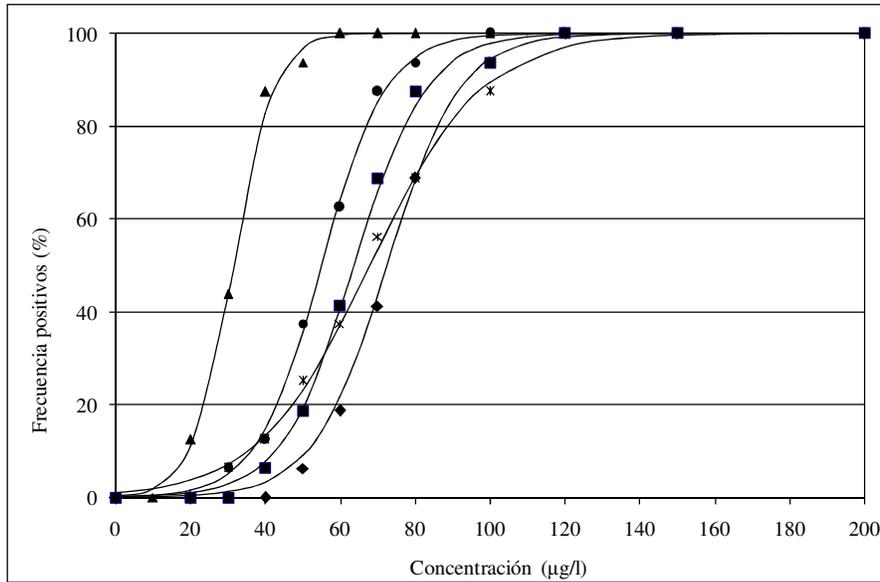


Figura 8. Curvas dosis respuestas de cefalosporinas en leche analizadas con el bioensayo BT (▲: cefadroxil, X: cefalexina, ◆: cefoperazona, ■: ceftiofur[®], ●: cefuroxime).

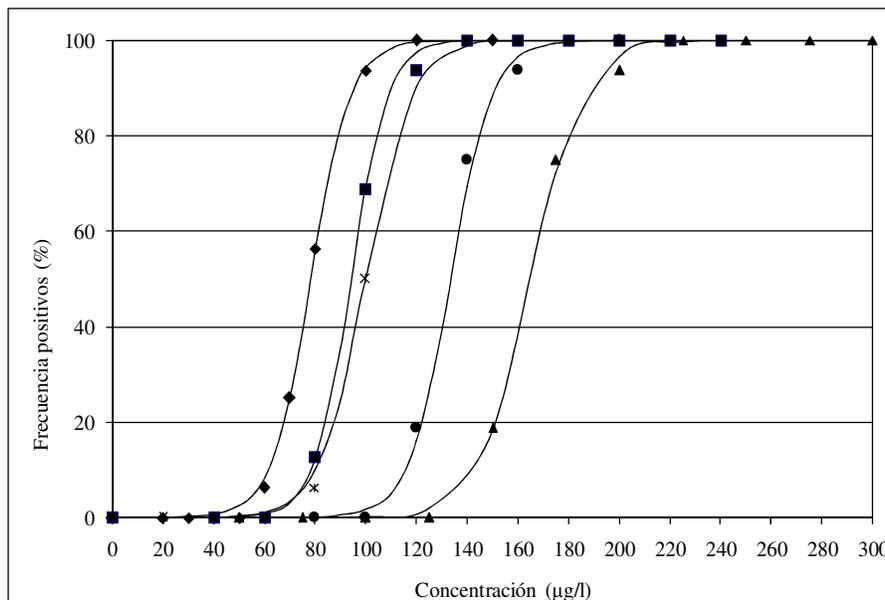


Figura 9. Curvas dosis respuestas de cefalosporinas en leche analizadas con el bioensayo BS (▲: cefadroxil, X: cefalexina, ◆: cefoperazona, ■: ceftiofur[®], ●: cefuroxime).

Para el bioensayo BS, incrementos en las concentraciones de cefalexina, cefoperazona y ceftiofur[®] comprendidos entre 40 µg/l y 120 µg/l serán suficientes para originar el 100% de respuesta positivas, sin embargo, los residuos de cefroxil (200 µg/l) y cefuroxime (180 µg/l) deben hallarse en la leche a mayores niveles para producir el 100% de resultados positivos al método ResScreen[®] BS.

La Tabla 16 resume los límites de detección de las cinco cefalosporinas calculados haciendo uso de las ecuaciones de la Tabla 15 y el criterio definido por FIL-IDF (2002), como el valor de la concentración que produce el 95% de resultados positivos al bioensayo.

Los límites de cefalexina y ceftiofur[®] en leche resultan similares a los LMRs publicados por la EEC para estas cefalosporinas, ya que están comprendidos entre 0.9 y 1.3 veces sus LMRs.

Tabla 16. Límites de detección de cefalosporinas en leche para los bioensayos BT y BS

Cefalosporinas	Límites de detección del método		LMR
	Bioensayo BT	Bioensayo BT	
Cefadroxil	47,6	195,6	-
Cefalexina	111,9	126,6	100
Cefoperazona	101,1	101,0	50
Ceftiofur [®]	92,0	115,2	100
Cefuroxime	80,3	157,1	-

LD: Límite de detección (µg/l), LMR: Límite Máximo de Residuo (µg/l).

Con respecto a este grupo de antibióticos betalactámicos, se debe destacar que ceftiofur[®] presentó límites de detección similares a las 100 µg/l calculados por Charm y Ruth (1993) para el método BRT[®] AiM, aunque Zorraquino (1997, 1998) obtiene valores más elevados (150 a 200 µg/l) cuando utiliza 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); Gardnen *et al.* (1996) y Sischo (1996) indican niveles más bajos (50 µg/l) al calculado para los bioensayos BT y BS, mientras que el método Copan[®] CH-ATK Test muestra un rango 50-100 µg/l (Roca *et al.*, 2007).

Los límites de detección del cefoperazone en leche para los bioensayos BT y BS resultan levemente superiores a las 80 µg/l señaladas por Jaskch (1988) para el método BRT[®] AiM. No obstante, Zorraquino (1997, 1998) obtiene un valor muy bajo (42 µg/l) para este método. Este autor calcula para la cefalexina un límite de detección de 270 µg/l, superior a los niveles expuestos en la Tabla 16. En lo que se refiere a los LDs del cefadroxil y cefuroxime, se debe destacar que no se han encontrado valores de referencia en la bibliografía consultada.

También los límites de la Tabla 16 se hallan dentro de los rangos publicados por otros autores en leche de oveja cuando utilizan los métodos BRT[®] AiM (230 µg/l cefadroxil; 270 µg/l de cefalexina, 92 µg/l de cefoperazona, 120 µg/l de Ceftiofur[®] y 69 µg/l de cefuroxime) por Molina *et al.* (2003), 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) según Althaus *et al.* (2002) y Eclipse[®] 100ov (86 µg/l de cefadroxil, 115 µg/l de cefalexina, 110 µg/l de cefoperazona y 85 µg/l de cefuroxime) según Montero *et al.* (2005).

Los resultados de la Tabla 16 fueron similares a los determinados por Nagel (2009) para el bioensayo BT ($LD_{CLX} = 99 \mu\text{g/l}$, $LD_{CPZ} = 62 \mu\text{g/l}$, $LD_{CFR} = 105 \mu\text{g/l}$, $LD_{CFU} = 52 \mu\text{g/l}$) y BS ($LD_{CLX} = 160 \mu\text{g/l}$, $LD_{CPZ} = 94 \mu\text{g/l}$, $LD_{CFR} = 115 \mu\text{g/l}$, $LD_{CFU} = 170 \mu\text{g/l}$) con predifusión de los antimicrobianos.

- **Sulfonamidas:** Las ecuaciones de regresión logística calculadas a partir de las frecuencias de resultados positivos de los bioensayos BT y BS para las cinco sulfamidas estudiadas, se muestran en la Tabla 17.

Los valores de los coeficientes “ β_1 ” para las cinco sulfamidas analizadas con el bioensayo BT fueron más bajos que los calculados para el bioensayo BS. Este hecho se debe a la diferencia en la composición de ambos medios de cultivo, puesto que el bioensayo BS contiene trimetoprim para mejorar la sensibilidad hacia las sulfamidas (Nagel *et al.*, 2009c), mientras que el bioensayo BT fue optimizado para la detección de tetraciclinas mediante la incorporación de cloranfenicol en el medio de cultivo (Nagel *et al.*, 2009b).

Tabla 17. Modelos logísticos que expresan los efectos de concentración de sulfamidas sobre la frecuencia de resultados positivos al sistema Rescreen[®]

	Sulfamidas	Logit [P_{ijkl}] = $\beta_0 + \beta_1$ [SAs] _i	C
Bioensayo BT	Sulfadiazina	Logit [P] = - 7,27425 + 0,0005*[SDZ]	72,4
	Sulfadimetoxina	Logit [P] = - 12,7103 + 0,0024*[SDM]	75,3
	Sulfametazina	Logit [P] = - 11,0826 + 0,0005*[SMZ]	87,7
	Sulfametoxazol	Logit [P] = - 10,9097 + 0,0034*[SMX]	81,2
	Sulfatiazol	Logit [P] = - 9,0462 + 0,0028*[STZ]	77,2
Bioensayo BS	Sulfadiazina	Logit [P] = - 3,9771 + 0,0118*[SDZ]	79,9
	Sulfadimetoxina	Logit [P] = - 3,68224 + 0,0207*[SDM]	76,9
	Sulfametazina	Logit [P] = - 4,3537 + 0,0152*[SMZ]	83,6
	Sulfametoxazol	Logit [P] = - 7,0127 + 0,0508*[SMX]	86,3
	Sulfatiazol	Logit [P] = - 4,4361 + 0,0506*[STZ]	82,1

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

Por su parte, los ajustes logrados mediante la aplicación del modelo logístico han sido muy buenos, con coeficientes de concordancia porcentuales comprendidos

entre 72,4 % para sulfadiazina y 87,7 % para sulfametazina, ambos calculados para el bioensayo BT.

Además, se puede apreciar para el bioensayo BS, que los mayores valores de los coeficientes “ β_1 ” se obtuvieron para residuos de sulfametoxazol y sulfatiazol en comparación con el resto de las sulfamidas analizadas, debido a una mayor acción sinérgica de estos fármacos con el trimetoprim presente en el medio de cultivo.

Haciendo uso de las ecuaciones de la Tabla 17 se construyeron Figura 10 y Figura 11 donde se visualiza el efecto de las concentraciones de sulfamidas en leche sobre las frecuencias de resultados positivos a los bioensayos BT y BS, respectivamente.

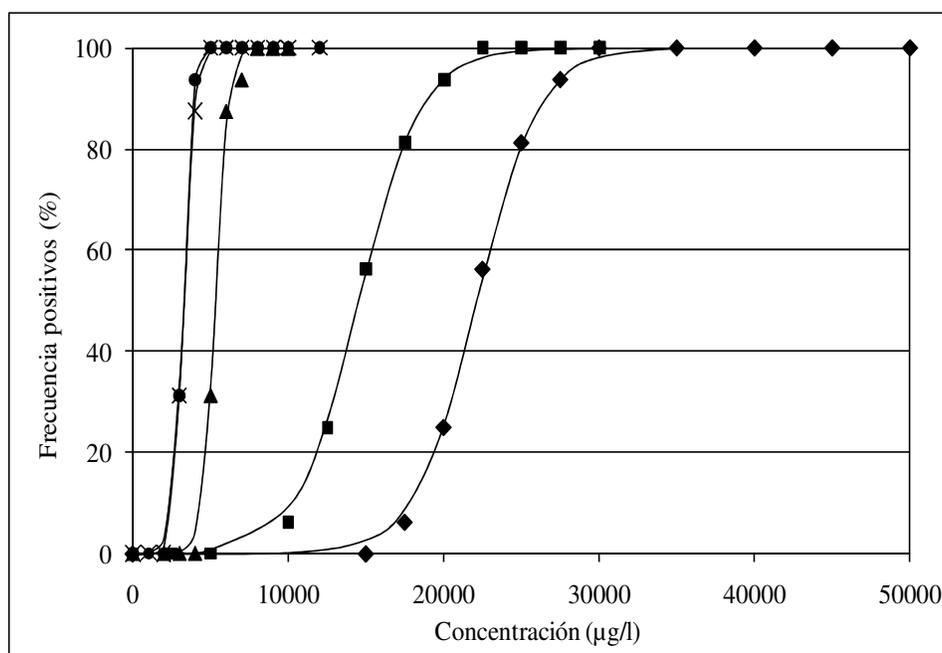


Figura 10. Curvas dosis respuestas de sulfamidas en leche analizadas con el bioensayo BT (■: sulfadiazina, ▲: sulfadimetoxina, ◆: sulfametazina, ●: sulfametoxazol, X: sulfatiazol).

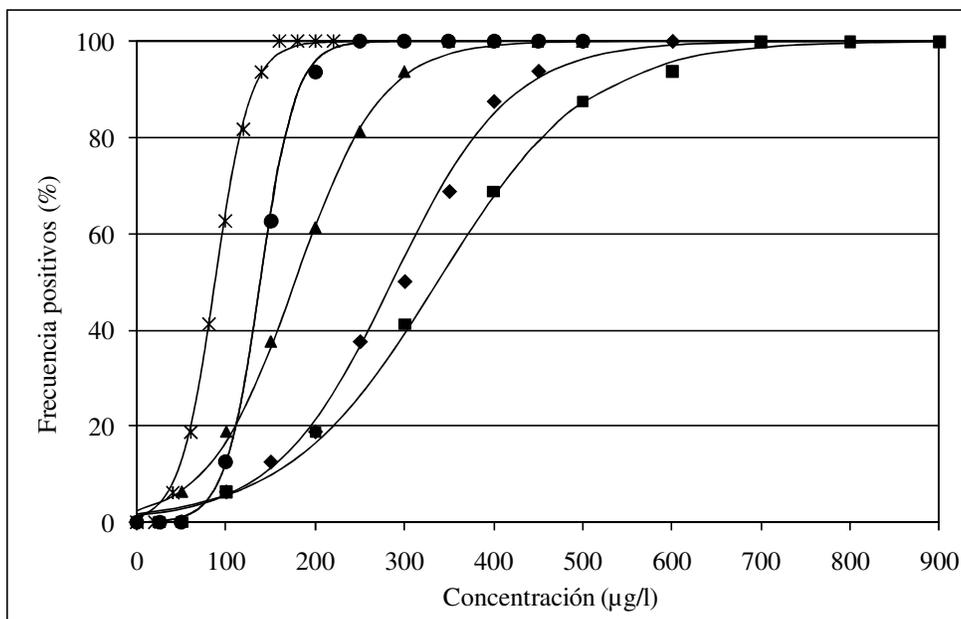


Figura 11. Curvas dosis respuestas de sulfamidas en leche analizadas con el bioensayo BS (■: sulfadiazina, ▲: sulfadimetoxina, ◆: sulfametazina, ●: sulfametoxazol, x: sulfatiazol).

En la Figura 10 se observa que se necesitarán incrementos de 5000 µg/l de sulfadimetoxina, sulfametoxazol o sulfatiazol para producir un 100% de resultados positivos al bioensayo BT, mientras que sulfametazina y sulfadiazina deben estar presentes en la leche a mayores concentraciones para ser detectadas por este método (30000 µg/l y 20000 µg/l, respectivamente).

Por el contrario, la Figura 11 muestra los efectos de las concentraciones de sulfamidas sobre la respuesta del bioensayo BS, sensible a las sulfamidas. En este caso, serán necesarios niveles de sulfadiazina, sulfametoxazol y sulfatiazol en leche inferiores a las 100 µg/l para acusar resultados positivos a este método, mientras que sulfametazina y sulfadimetoxina deberán estar presentes en la leche a concentraciones más elevadas (450 µg/l y 600 µg/l) para ser detectadas por el bioensayo BS.

En la Tabla 18 se resumen los límites de detección calculados mediante el criterio del 95% de resultados positivos para las cinco sulfamidas evaluadas mediante

los bioensayos BT y BS. Se observa que los LDs resultaron más elevados cuando las determinaciones se efectúan con el primer método que al emplear el segundo bioensayo.

Tabla 18. Límites de detección de sulfamidas en leche para el sistema Resscreen®

Sulfamidas	Límites de detección del método		LMR
	Bioensayo BT	Bioensayo BS	
Sulfadiazina	20437	587	100
Sulfadimetoxina	6523	319	100
Sulfametazina	28054	480	100
Sulfametoxazol	4075	196	100
Sulfatiazol	4282	146	100

LD: Límite de detección ($\mu\text{g/l}$), LMR: Límite Máximo de Residuo ($\mu\text{g/l}$).

También se aprecia que el bioensayo BS detecta residuos de sulfametoxazol y sulfatiazol en la leche a niveles levemente superiores a sus LMR ($100 \mu\text{g/l}$), mientras que los límites de detección de sulfadiazina, sulfadimetoxina y sulfametazina fueron superiores a sus LMRs.

Para otros métodos que emplean *Gb. stearotherophilus* sin la incorporación de antifolatos (trimetoprim o pirimetamina) en el medio de cultivo, otros autores han calculado límites de detección elevados para el método BRT® AiM. Por ejemplo, Frank (1995) señala rangos de $5000\text{-}10000 \mu\text{g/l}$ para sulfatiazol y $15000\text{-}50000 \mu\text{g/l}$ para sulfameazina, mientras que Zorraquino (1997) establece para esta sulfamida en leche de vaca un rango de $4800\text{-}5100 \mu\text{g/l}$, valores similares al observado para el bioensayo BT sin la incorporación de TMP en el medio del cultivo.

En leche de oveja, cuando se utiliza el método BRT® AiM (que no contiene trimetoprim), Althaus (1999) y Molina *et al.* (2003) calculan elevados niveles de detección para sulfadiazina ($5400 \mu\text{g/l}$), sulfametoxazol ($3200 \mu\text{g/l}$),

sulfametoxipiridazina (6500 µg/l) y sulfaquinoxalina (6200 µg/l) similares a los expuestos en la Tabla IV.7 para el bioensayo BT.

Sin embargo, cuando se comparan los resultados obtenidos para el bioensayo BS de la Tabla 18 con los reportados por otros autores al emplear métodos fortificados con antifolatos en el medio de cultivo, se observa que los límites del bioensayo BS fueron similares a los calculados para los métodos Delvotest[®] "SP" (260 µg/l de SDM y 110 µg/l de SMX) según Althaus *et al.* (2002), Copan CH-ATK[®] Test (50-100 µg/l de STZ, 50-100 µg/l de SDZ 100-200 µg/l de SMT) y Eclipse[®] "100ov" (170 µg/l de SDM, 750 µg/l de SMZ y 250 µg/l de STZ) según el estudio efectuado por Montero *et al.*, (2004).

En forma similar, Nagel (2009) cuando emplea el sistema ResScreen[®] con predifusión durante una hora de los antimicrobianos obtiene elevados límites de detección para el bioensayo BT ($LD_{SDZ} = 49000$ µg/l, $LD_{SDM} = 6523$ µg/l, $LD_{SMZ} = 28054$ µg/l, $LD_{SMX} = 4075$ µg/l, $LD_{STZ} = 4282$ µg/l) y niveles buenos para el bioensayo BS ($LD_{SDZ} = 164$ µg/l, $LD_{SDM} = 260$ µg/l, $LD_{SMZ} = 610$ µg/l, $LD_{SMX} = 120$ µg/l, $LD_{STZ} = 100$ µg/l).

- **Tetraciclinas:** La Tabla 19 resume los resultados de la aplicación del modelo de regresión logístico a las calificaciones visuales de las tetraciclinas en leche analizadas con los bioensayos BT y BS.

Para aquellas tetraciclinas que presentan LMRs (clortetraciclina, oxitetraciclina y tetraciclina), se observa que el bioensayo BT posee mayores valores en sus coeficientes " β_1 " que bioensayo BS, debido a la incorporación cloranfenicol en el medio de cultivo (Nagel *et al.*, 2009b).

Tabla 19. Modelos logísticos que expresan los efectos de concentración de tetraciclinas sobre la frecuencia de resultados positivos al sistema ResScreen®

	Tetraciclinas	Logit $[P_{ijkl}] = \beta_0 + \beta_1 [TCs]_i$	C
Bioensayo BT	Clortetraciclina	Logit [P] = -11,1323 + 0,071461*[CTC]	90,1
	Doxicilina	Logit [P] = - 6,4501 + 0,1199*[DOX]	86,3
	Meclociclina	Logit [P] = - 3,9824 + 0,0742*[MC]	77,2
	Oxitetraciclina	Logit [P] = - 9,4543 + 0,0903*[OTC]	86,0
	Rolitetraciclina	Logit [P] = - 14,4016 + 0,1356*[RTC]	88,0
	Tetraciclina	Logit [P] = - 5,9074 + 0,0611*[TC]	79,2
Bioensayo BS	Clortetraciclina	Logit [P] = -10,1256 + 0,00357*[CTC]	97,7
	Doxicilina	Logit [P] = - 23,6439 + 0,1524*[DOX]	92,5
	Meclociclina	Logit [P] = - 11,3986 + 0,0894*[MC]	88,0
	Oxitetraciclina	Logit [P] = - 9,9593 + 0,0156*[OTC]	97,0
	Rolitetraciclina	Logit [P] = - 22,6924 + 0,0448*[RTC]	90,7
	Tetraciclina	Logit [P]= - 26,5894 + 0,0412 [TC]	99,4

TCs: tetraciclinas, CTC: clortetraclina, DOX: doxicilina, MC: meclociclina, RTC: rolitetraciclina, OTC: oxitetraciclina, TC: tetraciclina, C: Coeficiente de concordancia porcentual.

Los ajustes alcanzados mediante la utilización del modelo de regresión logístico han sido buenos, con coeficientes de concordancia porcentuales comprendidos entre 77,2 % para la meclociclina (bioensayo BT) y 99,4 % para la tetraciclina (bioensayo BS), según se aprecia en Tabla 19.

Figura 12 y Figura 13 visualizan el efecto de las concentraciones de las seis tetraciclinas presentes en las muestras de leche sobre las frecuencias relativas de resultados positivos a los bioensayos BT y BS, respectivamente.

Para el bioensayo BT, concentraciones de 150 µg/l de oxitetraciclina y tetraciclina producen un 100% de resultados positivos, mientras que clortetraciclina debe estar presente a concentraciones más elevadas (350 µg/l). Por el contrario, para observar cambios en la respuesta del bioensayo BS. Los residuos de oxitetraciclina y

tetraciclina deben hallarse en la leche a una concentración de 1000 $\mu\text{g/l}$, mientras que clortetraciclina debe estar presente a un nivel de 4500 $\mu\text{g/l}$.

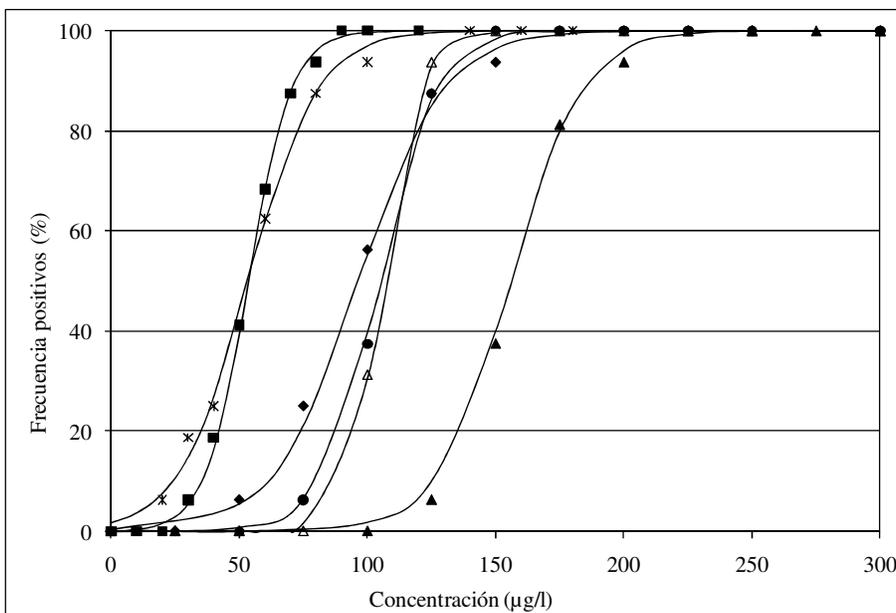


Figura 12. Curvas dosis respuestas de tetraciclinas de leche analizadas con el bioensayo BT (■: doxiciclina, ▲: clortetraciclina, X: meclociclina, ●: oxitetraciclina, Δ: rolitetraciclina, ◆: tetraciclina).

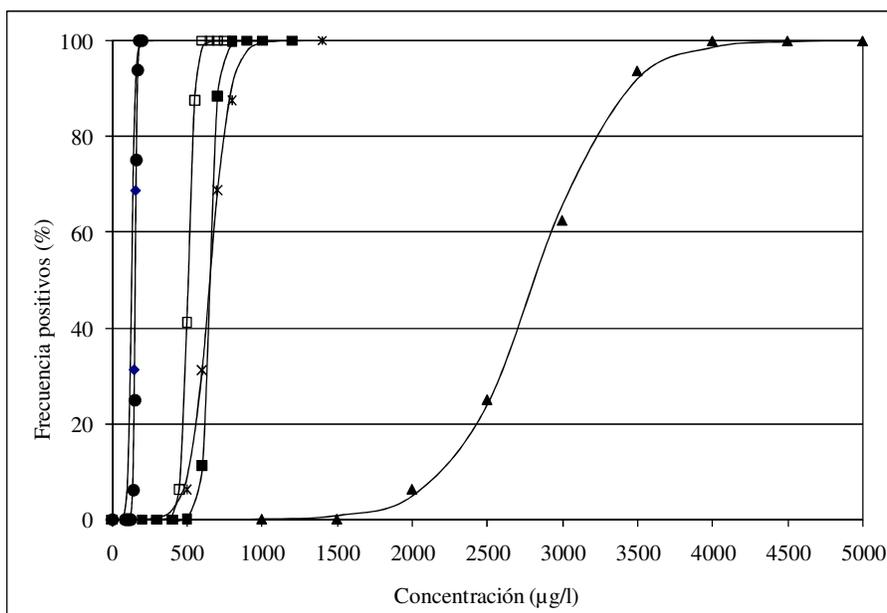


Figura 13. Curvas dosis respuestas de tetraciclinas de leche analizadas con el bioensayo BS (■: doxiciclina, ▲: clortetraciclina, X: meclociclina, ●: oxitetraciclina, Δ: rolitetraciclina, ◆: tetraciclina).

Los límites de detección calculados mediante las ecuaciones logísticas (Tabla 19) se resumen en la Tabla 20. Para el bioensayo BT, se observa que clortetraciclina presentó un valor más elevado en su nivel de detección que oxitetraciclina y tetraciclina. Este hecho obedece a su menor valor del coeficiente “ β_1 ” (0,07146) en comparación con las otras tetraciclinas (Tabla 19).

Tabla 20. Límites de detección de tetraciclinas en leche para el sistema Resscreen[®]

Tetraciclina	Límites de detección del método		LMR
	Bioensayo BT	Bioensayo BS	
Clortetraciclina	197	3635	100
Doxicilina	78	174	-
Meclociclina	93	160	-
Oxitetraciclina	137	843	100
Rolitetraciclina	128	572	-
Tetraciclina	145	722	100

LD: Límite de detección ($\mu\text{g/l}$), LMR: Límite Máximo de Residuo ($\mu\text{g/l}$).

Con respecto al bioensayo BS que utiliza Müeller Hinton como medio de cultivo e indicador de óxido-reducción negro brillante se debe destacar que presenta elevados niveles de detección para las tetraciclinas. En forma similar, otros métodos que utilizan un medio similar y no adicionan cloranfenicol, como por ejemplo el método BRT[®] AiM, también presenta límites altos para residuos de tetraciclina (2000-5000 $\mu\text{g/l}$) y oxitetraciclina (1500-5000 $\mu\text{g/l}$) en leche, según Frank (1995). De igual forma, Molina *et al.* (2003) detectan valores elevados (5500 $\mu\text{g/l}$ de OTC y 6200 $\mu\text{g/l}$ de TC) para el método BRT[®] AiM con muestras de leche de oveja.

Cuando se comparan los límites de detección de las tetraciclinas obtenidos para el bioensayo BT que contiene cloranfenicol en el medio de cultivo (Nagel *et al.*, 2009b) con los LMRs, los mismos son muy próximos para tetraciclina y clortetraciclina.

Otros métodos de inhibición microbiológica que utilizan *Gb. stearothermophilus*, como por ejemplo el método Delvotest SP, presenta límites de detección para oxitetraciclina de 400 µg/l (Zaadhof *et al.*, 1997) o de 500 µg/l (Luitz y Suhren, 1996) y de 600 µg/l (Senyk *et al.*, 1990) para tetraciclina en leche, todos ellos superiores a los obtenidos en este trabajo para el bioensayo BT.

En forma similar, el método Eclipse[®] 100ov puede detectar 500 µg/l de clortetraciclina y 460 µg/l de tetraciclina en leche de oveja (Montero *et al.*, 2005), valores superiores a los alcanzados en este trabajo para un bioensayo BT suplementado con CAP en el medio de cultivo.

El método Delvotest[®] SP posee límites de detección superiores a los calculados en este trabajo, ya que detecta 320 µg/l de oxitetraciclina y 590 µg/l de tetraciclina en leche de oveja (Althaus *et al.*, 2002).

También, Nagel (2009) obtiene adecuados límites de detección para la clortetraciclina, oxitetraciclina y tetraciclina en leche cuando emplea el bioensayo BT (275, 150 y 158, respectivamente) y elevados niveles para el bioensayo BS (3600, 850 y 720, respectivamente) con predifusión de los antimicrobianos.

Otros antimicrobianos : La Tabla 21 resume las ecuaciones de los modelos de regresión logísticos obtenidos a través del estudio de las calificaciones visuales de lincomicina, neomicina y tilosina en leche, analizados mediante los bioensayos BT y BS.

El coeficiente “ β_1 ” para tilosina resultó superior a los calculados para lincomicina y neomicina, señalando una mayor sensibilidad de la bacteria test para este macrólido, en comparación con los otros.

Las concordancias porcentuales fueron muy buenas (superiores al 98%) para los tres antimicrobianos analizados por ambos bioensayos, poniendo de manifiesto un

adecuado ajuste logístico. El efecto de las concentraciones de lincomicina, neomicina y tilosina sobre la respuesta de los bioensayos BT y BS se visualizan en Figura 14 y Figura 15, respectivamente.

Tabla 21. Modelos logísticos que expresan los efectos de concentración de otros antimicrobianos en leche analizadas con el sistema Resscreen®

	Antimicrobianos	Logit $[P_{ijkl}] = \beta_0 + \beta_1 [ATB]_i$	C
Bioensayo BT	Lincomicina	Logit [P] = - 5,7269 + 0,0456 [LIN]	98,7
	Neomicina	Logit [P] = - 7,4852 + 0,0127 [NEO]	98,1
	Tilosina	Logit [P] = - 5,8910 + 0,1217 [TIL]	97,9
Bioensayo BS	Lincomicina	Logit [P] = - 6,7804 + 0,0603 [LIN]	99,6
	Neomicina	Logit [P] = - 9,3164 + 0,0095 [NEO]	99,3
	Tilosina	Logit [P] = - 16,6324 + 0,4277 [TIL]	99,7

ATB: antibiótico, LIN: lincomicina, NEO: neomicina, TIL: tilosina, C: Coeficiente de concordancia porcentual.

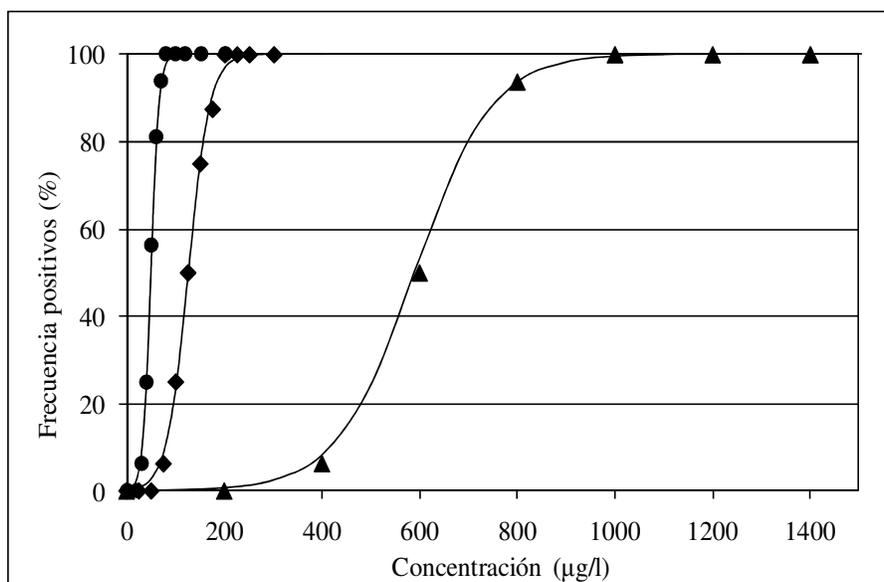


Figura 14. Curvas dosis respuestas de otros antimicrobianos en leche analizadas con el bioensayo BT (♦: lincomicina, ▲: neomicina, ●: tilosina)

En ambas gráficas se puede observar que incrementos de 100 µg/l de tilosina resultan suficientes para producir un 100% de resultados positivos a ambos métodos,

mientras que la lincomicina debe estar presente en la leche a una concentración mayor (200 µg/l). Neomicina, por su parte, debe hallarse a un nivel de 1000 µg/l (bioensayo BT) y 1400 µg/l (bioensayo BS) para ser detectados por estos métodos.

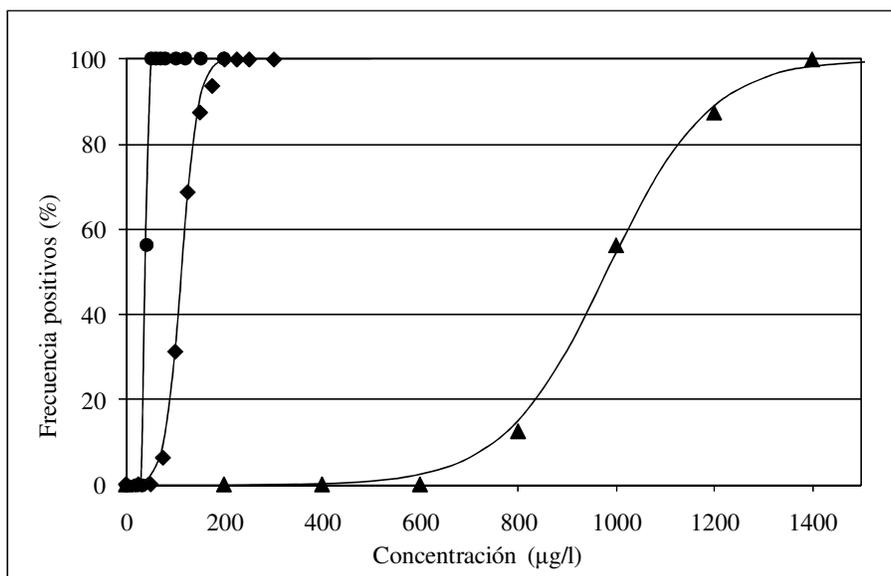


Figura 15. Curvas dosis respuestas de otros antimicrobianos en leche analizadas con el bioensayo BS (◆: lincomicina, ▲: neomicina, ●: tilosina)

Los límites de detección de los tres antibióticos calculados a partir de las ecuaciones logísticas de la Tabla 21 para los dos bioensayos se resumen en la Tabla 22. Además, se informan los LMRs establecidos por la Unión Europea para estos antimicrobianos en leche.

Tabla 22. Límites de detección de otros antimicrobianos en leche para el sistema Resscreen®

Otros antimicrobianos	Límites de detección del método		LMR
	Bioensayo BT	Bioensayo BS	
Lincomicina	190,2	161,3	200
Neomicina	821,2	1290,6	1500
Tilosina	72,6	45,8	50

LD: Límite de detección (µg/l), LMR: Límite Máximo de Residuo (µg/l).

Los límites de detección de lincomicina y neomicina calculados para ambos métodos son inferiores a los LMRs, pudiendo ser detectados en la leche procedente de animales individuales antes de su remisión a la industria láctea. Sin embargo, los residuos de tilosina son detectados a un nivel cercano al LMR por el bioensayo BS y a un nivel levemente superior por el bioensayo BT.

Cuando se comparan los límites de detección de la neomicina de este método con los reportados por otros autores, se debe destacar que los valores de Tabla 22 se encuentran dentro del rango de 300 a 5000 $\mu\text{g/l}$ establecido para BRT[®] AiM (Analytic in Milch, 1998), pero resultan superiores a las 500 $\mu\text{g/l}$ determinado por Charm y Ruth (1993) para este método.

Para el método Eclipse[®] 100ov, Montero *et al.* (2005) señalan niveles elevados para residuos de neomicina (9100 $\mu\text{g/l}$) en leche de oveja, mientras que Linage *et al.* (2007) calculan un rango de 915-1084 $\mu\text{g/l}$ de neomicina en cuando utilizan el método Blue-Yellow Test Charm[®] con muestras de leche de oveja.

Con respecto a los límites de detección de tilosina (Tabla 22), hay que mencionar que resultaron próximos a las 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, 1997, 1998) determinados para el método BRT[®] AiM.

En leche de oveja, Molina *et al.* (2003) y Althaus *et al.* (2002) detectan 120 $\mu\text{g/l}$ de tilosina cuando utilizan los métodos BRT[®] AiM y Delvotest[®] SP, respectivamente. Montero *et al.* (2005) reportan 230 $\mu\text{g/l}$ de tilosina para el método Eclipse[®] 100ov, mientras que Linage *et al.* (2007) informan para este antibiótico, un rango de 44-51 $\mu\text{g/l}$ al emplear el método Blue -Yellow Test Charm[®].

Por último, se debe destacar que Nagel (2009) obtiene niveles similares a los calculados en este trabajo para el bioensayo BT ($LD_{\text{LIN}} = 150 \mu\text{g/l}$, $LD_{\text{NEO}} = 600 \mu\text{g/l}$,

$LD_{LIN} = 74 \mu\text{g/l}$) y BS ($LD_{LIN} = 220 \mu\text{g/l}$, $LD_{NEO} = 1200 \mu\text{g/l}$, $LD_{LIN} = 50 \mu\text{g/l}$) con predifusión durante un tiempo de una hora de los antimicrobianos.

IV.2. EXPERIMENTO 2: UTILIZACIÓN DEL SISTEMA RESSCREEN® EN TAMBO PARA LA DETERMINACIÓN DEL PERÍODO DE RETIRO DE VACAS TRATADAS

IV.2.1. Animales con mastitis parenquimatosa tratados con sulfadoxina/trimetoprim

El efecto del número de ordeños sobre las frecuencias relativas porcentuales de resultados positivos al bioensayo BS y Delvotest® MCS para vacas lactantes tratadas con sulfadoxina/trimetoprim (Radixal® inyectable) se resume en la Tabla 23. Para este tratamiento, las muestras de leche no fueron analizadas con el bioensayo BT puesto que no posee sensibilidad para detectar residuos de sulfamidas en leche.

Tabla 23. Efecto del número de ordeños sobre las frecuencias de respuestas positivas a los métodos de inhibidores para vacas tratadas con sulfadoxina/trimetoprim (Radixal®)

Método	Dia 1		Dia 2		Dia 3		Dia 4		Dia 5	
	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T
ResScreen® BS	100	83.3	16.6	0	0	0	0	0	0	0
Delvotest® MCS	100	66.7	0	0	0	0	0	0	0	0

M: Mañana; T: Tarde.

Se observa que el bioensayo BS detecta residuos de sulfadoxina/trimetoprim hasta el tercer ordeño, mientras que el método Delvotest® MCS lo hace hasta el segundo ordeño.

La aplicación del modelo de regresión logística permite obtener las ecuaciones que estiman las frecuencias de resultados positivos en función del número de ordeños,

según se muestra en la Tabla 24. El bioensayo BS presenta menor valor absoluto del coeficiente “ β_1 ” en comparación con el otro método, debido a su mayor sensibilidad para los residuos del compuesto sulfadoxina/trimetoprim, ya que puede detectarlo hasta el tercer ordeño luego de su aplicación. Por otra parte, los ajustes logrados mediante el modelo logístico fueron buenos, por los elevados valores de los coeficientes de concordancia.

Tabla 24. Ecuaciones logísticas que expresan el efecto del número de ordeño sobre la frecuencia de respuestas positivas a los métodos de inhibidores en vacas tratadas con sulfadoxina/trimetoprim (Radixal[®])

Método	Logit $[P_{ij}] = \beta_0 + \beta_1 [NO]_i$	C
Bioensayo BS	Logit [P] = 8,6773 - 3,508 [NO]	83,08
Delvotest [®] MCS	Logit [P] = 37,6518 - 18,4793 [NO]	86,84

NO: Número de ordeños, C: Coeficiente de concordancia porcentual.

La Figura 16 muestra las curvas de eliminación del fármaco en la leche. Resulta evidente que, para el cuarto ordeño, las muestras de leche no presentan residuos a niveles superiores a los límites de detección de ambos métodos, motivo por el cual la leche procedente de estos animales tratados puede comercializarse a las empresas lácteas a partir del tercer día post-tratamiento.

Cuando se comparan los resultados estimados por el modelo logístico, con el tiempo de retirada sugerido por la casa fabricante del producto Radixal[®] (8 ordeños) se observa que la eliminación completa de los inhibidores procedentes del tratamiento con sulfadoxina/trimetoprim se produce al cuarto ordeño (2 días post-tratamiento). Por ello, el productor o médico veterinario, al disponer de un kit para la detección de residuos de inhibidores en el propio tambo, podría comercializar la leche antes de esperar el tiempo sugerido por la casa fabricante. De este modo, el productor obtendría beneficios económicos, al poder vender la leche producida entre el cuarto y octavo ordeño.

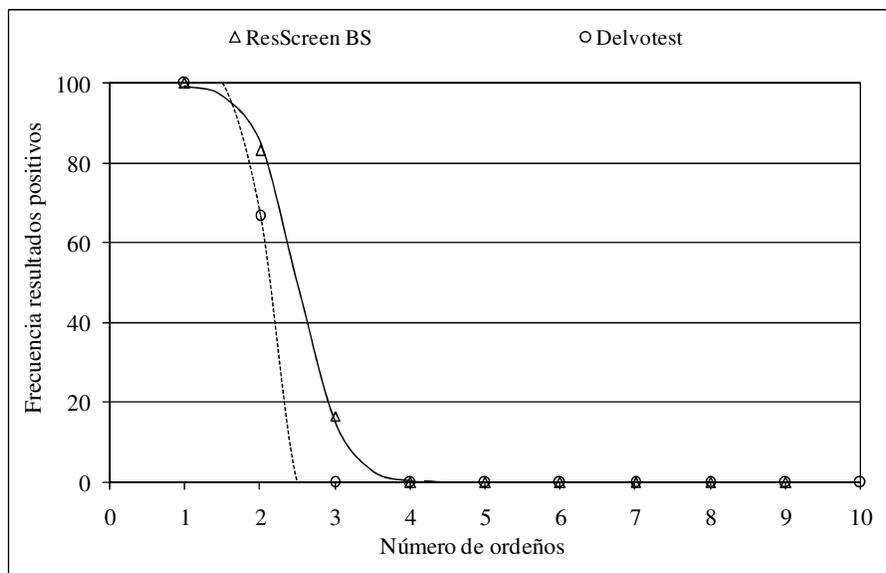


Figura 16. Efecto del número de ordeños sobre las frecuencias de resultados positivos a los métodos de inhibidores utilizados con leche de vacas tratadas con sulfadoxina/trimetoprim (Radixal®).

IV.2.2 Animales con mastitis catarral tratados con amoxicilina

Las frecuencias de resultados positivos a los métodos microbiológicos (ResScreen® y Delvotest® MCS) cuando se utilizan con muestras de leche procedentes de vacas tratadas con amoxicilina inyectable (Clamoxyl®) en función del número de ordeños se exponen en la Tabla 25.

Tabla 25. Efecto del número de ordeños sobre las frecuencias de respuestas positivas a los métodos de inhibidores para vacas tratadas con amoxicilina (Clamoxyl®)

Método	Dia 1		Dia 2		Dia 3		Dia 4		Dia 5		Dia 6		Dia 7	
	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T
Bioensayo BT	100	100	100	100	100	100	83.3	50	33.3	16.6	16.6	0	0	0
Bioensayo BS	100	100	100	100	83.3	66.6	50	33.3	33.3	16.6	16.6	0	0	0
Delvotest® MCS	100	100	100	100	100	66.6	66.6	50	33.3	33.3	16.6	0	0	0

M: Mañana; T: Tarde.

Los tres bioensayos revelan la presencia del 100% de resultados positivos hasta el segundo día post-tratamiento. A partir de este período, la frecuencia de casos positivos comienza a disminuir gradualmente hasta el ordeño de la tarde del sexto día, donde las respuestas positivas desaparecen por completo.

Las ecuaciones matemáticas calculadas mediante la aplicación del modelo de regresión logística a las frecuencias de resultados positivos como una función del número de ordeño se resumen en la Tabla 26.

Tabla 26. Ecuaciones logísticas que expresan el efecto del número de ordeño sobre la frecuencia de respuestas positivas a los métodos de inhibidores en vacas tratadas con amoxicilina (Clamoxyl®)

Método	Logit $[P_{ij}] = \beta_0 + \beta_1 [NO]_i$	C
Bioensayo BT	Logit [P] = 8,0828 - 0,9506 [NO]	74,12
Bioensayo BS	Logit [P] = 5,6451 - 0,7527 [NO]	75,96
Delvotest® MCS	Logit [P] = 6,4244 - 0,7861 [NO]	77,46

NO: Número de ordeños, C: Coeficiente de concordancia porcentual.

Las pendientes de los tres métodos son similares, ya que los coeficientes “ β_1 ” se encuentran comprendidos entre 0,7527 para el bioensayo BS y 0,9506 para el bioensayo BT. Por ello, las curvas de eliminación que se muestran en la Figura 17 están prácticamente superpuestas. Además, resulta evidente que recién hacia el séptimo día post-tratamiento (14 ordeños), los métodos indican la ausencia de actividad antimicrobiana, motivo por el cual la leche procedente de estos animales puede comercializarse libremente.

Sin embargo, es necesario destacar que desde el tercer día hasta el séptimo día post-tratamiento, las vacas tratadas comienzan a brindar gradualmente respuestas negativas a los diferentes métodos utilizados. Por ello, a medida que las muestras de

leche de los diferentes animales tratados comienzen a arrojar resultados negativos a estos métodos, los animales se podrán incorporar al grupo de vacas en ordeño.

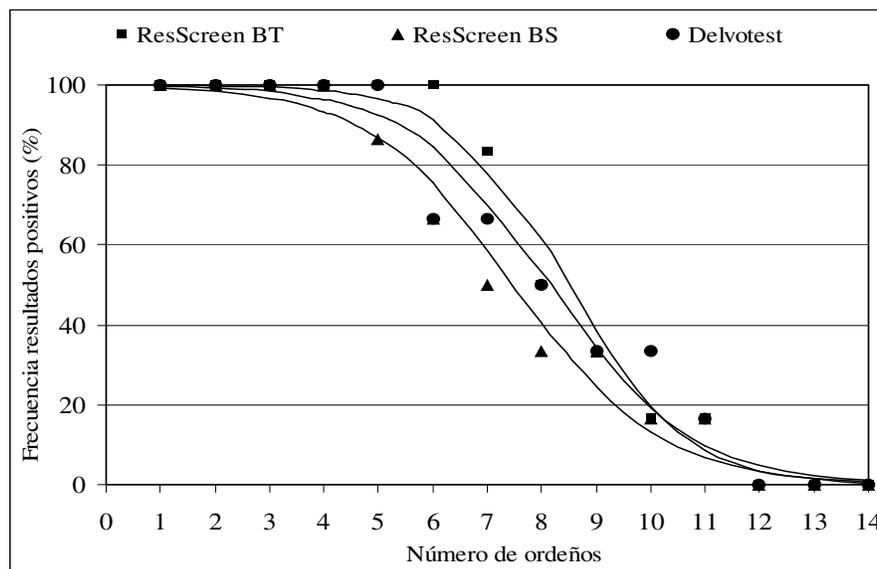


Figura 17. Efecto del número de ordeños sobre las frecuencias de resultados positivos a los métodos de inhibidores utilizados con leche de vacas tratadas con amoxicilina (Clamoxyl[®]).

Además, cuando se comparan los resultados de la Figura 17 con el tiempo de eliminación recomendado por la casa fabricante de Clamoxyl[®] (4 días, 8 ordeños), se evidencia que todos los animales eliminan leche con residuos de antimicrobianos, por ello, resulta conveniente disponer de un método para controlar dichos residuos en el tambo. Para ello, es necesario que los productores dispongan de un sistema de control de residuos en el propio tambo, ya que tendrían beneficios económicos al incorporar cada animal al ordeño en el momento que su leche esté libre de inhibidores.

IV.2.3 Animales con enfermedades podales tratados con tilosina

El grupo de seis animales que presentaron enfermedades podales fueron tratados con tilosina (Tylan[®]) en forma inyectable. Las frecuencias de resultados positivos al sistema ResScreen[®] y al método Delvotest[®] MCS en función del número de ordeños - después del tratamiento- se resumen en la Tabla 27.

Tabla 27. Efecto del número de ordeños sobre las frecuencias de respuestas positivas a los métodos de inhibidores para vacas tratadas con tilosina (Tylan[®])

Método	Dia 1		Dia 2		Dia 3		Dia 4		Dia 5		Dia 6	
	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T
Bioensayo BT	100	100	100	100	83.3	66.6	50	33.3	16.6	0	0	0
Bioensayo BS	100	100	100	100	100	100	83.3	66.6	50	33.3	16.6	0
Delvotest [®] MCS	100	100	100	100	100	100	66.6	50	33.3	16.6	0	0

M: Mañana; T: Tarde.

Se observa que hasta el segundo o tercer día, prácticamente todas las muestras de leche procedentes de los animales tratados presentaron resultados positivos a los métodos de inhibición microbiológica, para disminuir gradualmente hasta finales del sexto día del tratamiento.

El estudio estadístico mediante el modelo de regresión logística permite estimar las ecuaciones matemáticas que expresan la curva de eliminación de la tilosina como una función que relaciona la frecuencia de resultados positivos con el número de ordeños. Por ello, en la Tabla 28 se muestran las expresiones matemáticas para la cinética de eliminación de este fármaco en leche.

Para los tres métodos microbiológicos utilizados, los valores de los coeficientes “ β_1 ” son muy parecidos, poniendo de manifiesto una similitud en las curvas de eliminación de tilosina en leche. Además, los coeficientes de concordancia fueron muy buenos (superiores al 80%), revelando un adecuado ajuste con el modelo logístico.

Tabla 28. Ecuaciones logísticas que expresan el efecto del número de ordeño sobre la frecuencia de respuestas positivas a los métodos de inhibidores en vacas tratadas con tilosina (Tylan®)

Método	Logit $[P_{ij}] = \beta_0 + \beta_1 [NO]_i$	C
Bioensayo BT	Logit [P] = 7,9871 -1,1408 [NO]	85,37
Bioensayo BS	Logit [P] = 11,0782 -1,2067 [NO]	82,77
Delvotest® MCS	Logit [P] = 10,0389 -1,2287 [NO]	86,25

NO: Número de ordeños, C: Coeficiente de concordancia porcentual.

A fin de visualizar las curvas de eliminación de la tilosina en leche para los diferentes métodos microbiológicos empleados, se contruyó la Figura 18. Se observa que hasta el quinto ordeño, prácticamente todos los animales eliminan leche con actividad antimicrobiana, mientras que en el período comprendido entre dicho ordeño y el ordeño número 12 (sexto día post-tratamiento) la frecuencia de resultados positivos comienza a disminuir en forma gradual.

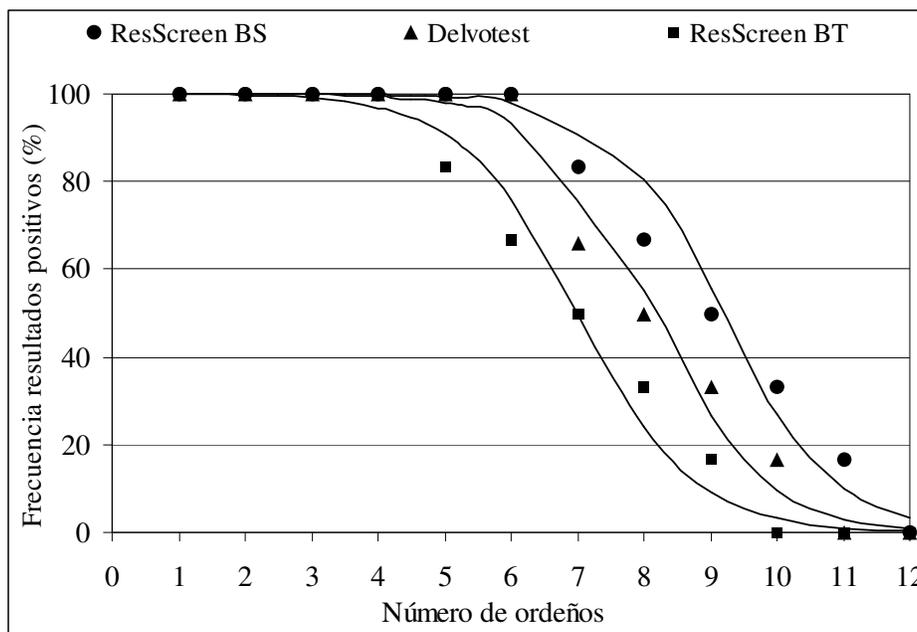


Figura 18. Efecto del número de ordeños sobre las frecuencias de resultados positivos a los métodos de inhibidores utilizados con leche de vacas tratadas con tilosina (Tylan®).

El tiempo de retirada recomendado por la casa fabricante de Tylan es de 4 días (8 ordeños). Según se aprecia en la Figura 18, para esa fecha, aproximadamente el 50% de los animales tratados continúan eliminando residuos de antimicrobianos en la leche. Este hecho señala, al igual que se observó para el tratamiento con amoxicilina, que las vacas tratadas pueden incorporarse al grupo de animales en ordeño en la medida que las determinaciones realizadas en el tambo comiencen a producir resultados negativos. De esta forma, el productor o el médico veterinario encargado de la explotación ganadera, puede decidir el momento oportuno para comercializar la leche de los animales medicamentados.

IV.2.4. Animales con retención de placenta tratados con oxitetraciclina

El tratamiento con oxitetraciclina (Terramicina[®]) en vacas lecheras mostró una frecuencia de resultados positivos a los métodos de inhibidores a lo largo del tratamiento que se sintetiza en la Tabla 29. El bioensayo BT que posee mejor sensibilidad para detectar residuos de tetraciclinas en leche, denota resultados positivos hasta el cuarto día post-tratamiento, mientras que los demás bioensayos -que no poseen buena sensibilidad para la detección de residuos de estas moléculas, indican resultados positivos hasta el segundo día del tratamiento.

Tabla 29. Efecto del número de ordeños sobre las frecuencias de respuestas positivas a los métodos de inhibidores para vacas tratadas con oxitetraciclina (Terramicina[®])

Método	Dia 1		Dia 2		Dia 3		Dia 4		Dia 5		Dia 6	
	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T
Bioensayo BT	100	100	100	83.3	50	33.3	16.6	16.6	0	0	0	0
Bioensayo BS	100	83.3	33.3	16.6	0	0	0	0	0	0	0	0
Delvotest [®] MCS	100	86.6	50	16.6	0	0	0	0	0	0	0	0

M: Mañana; T: Tarde.

El modelo de regresión logística permite calcular las curvas de eliminación de la oxitetraciclina en leche como una función del número de ordeño, como se muestra en la Tabla 30.

Tabla 30. Ecuaciones logísticas que expresan el efecto del número de ordeño sobre la frecuencia de respuestas positivas a los métodos de inhibidores en vacas tratadas con oxitetraciclina (Terramicina[®])

Método	Logit [P _{ij}] = $\beta_0 + \beta_1$ [NO] _i	C
Bioensayo BT	Logit [P] = 6,1524 -1,1192 [NO]	84.27
Bioensayo BS	Logit [P] = 5,6340 -1,9912 [NO]	92.53
Delvotest [®] MCS	Logit [P] = 5,8858-1,9640 [NO]	93.09

NO: Número de ordeños, C: Coeficiente de concordancia porcentual.

Según se comentara en párrafos anteriores, el bioensayo BT ($\beta_1 = 1.1192$) mostró menor valor absoluto del término “ β_1 ” en comparación con el bioensayo BS ($\beta_1 = 1.9912$) y el método Delvotest[®] MCS ($\beta_1 = 1.9640$), señalando una disminución más suave en la frecuencia de respuestas positivas al método, es decir, una mejor sensibilidad para la detección de los residuos de oxitetraciclina en la leche, debido a que contiene cloranfenicol en el medio de cultivo (Nagel *et al.*, 2009) a diferencia de los otros bioensayos que están potenciados para la detección de sulfamidas mediante la incorporación de trimetoprím en el medio (Nagel *et al.*, 2009).

Las curvas de eliminación de oxitetraciclina en leche procedente de animales tratados para los tres bioensayos empleados en este trabajo se muestran en la Figura 19. El bioensayo BS y Delvotest[®] MCS presentan una curva de eliminación prácticamente similar, mientras que el bioensayo BT posee mayor sensibilidad para detectar estos residuos y por lo tanto constituye una mayor garantía para asegurar la inocuidad de la leche cuando los animales se tratan con tetraciclinas.

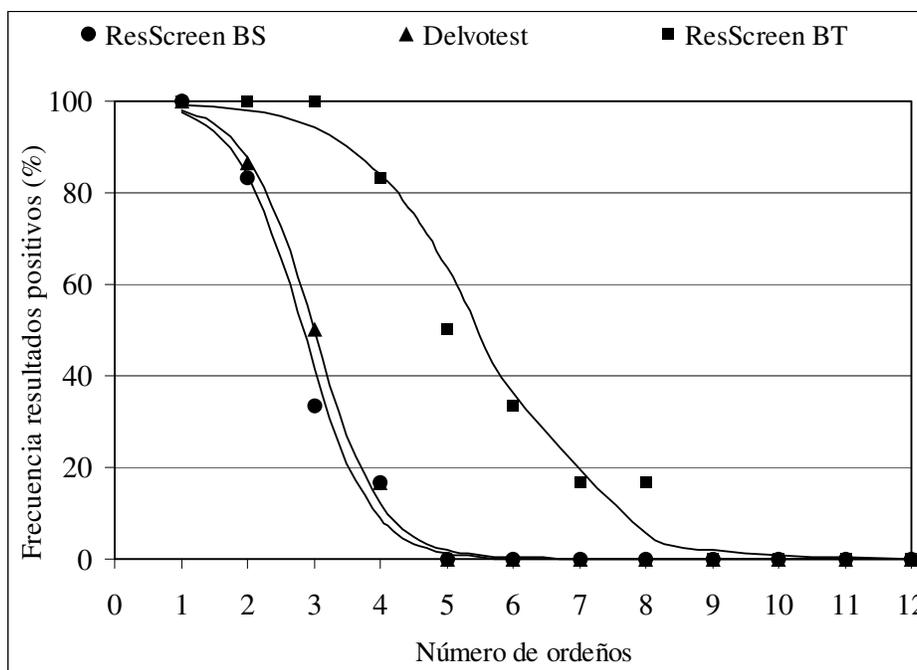


Figura 19. Efecto del número de ordeños sobre las frecuencias de resultados positivos a los métodos de inhibidores utilizados con leche de vacas tratadas con oxitetraciclina (Terramicina[®]).

Por otra parte, las muestras de leche comprendidas entre el segundo y octavo ordeño brindan resultados negativos a la pruebas de inhibidores en leche, revelando que la leche de estas vacas puede comercializarse e incorporarse a la cadena alimenticia, con la seguridad que le confiere al productor la posibilidad de haber realizado los análisis en su propio tambo, motivo por el cual, no recibirá castigos ni penalizaciones debido a una entrega de leche con residuos.

Sin embargo, la casa fabricante no establece período de seguridad para animales en ordeño, simplemente, menciona en el caso de ganado vacuno productor de carne que, los animales tratados con oxitetraciclina (Terramicina[®]) no deberán sacrificarse antes de los 21 días de finalizado el tratamiento. Por ello, resulta conveniente llevar a cabo el control de residuos en la propia explotación tambera.

VI. CONCLUSIONES

De los resultados de este trabajo se deducen una serie de conclusiones para la aplicación del sistema microbiológico Resscreen® sin predifusión en el tambo que se exponen a continuación.

- Propiedades del sistema microbiológico Resscreen®: Posee muy buena sensibilidad cuando se emplea con muestras de leche libres de antibióticos, con valores de 99,0 % para el bioensayo BT y de 98,4 % para el bioensayo BS, similares al método Delvotest MCS que presentó una sensibilidad del 99,5 %.

Este sistema permite detectar residuos de antibióticos betalactámicos (amoxicilina, ampicilina, cloxacilina, oxacilina, penicilina, cefalexina, cefoperazone y ceftiofur®), tetraciclinas (tetraciclina y oxitetraciclina), sulfamidas (sulfadimetoxina, sulfametazina, sulfametoxazol y sulfatiazol), lincomicina, neomicina y tilosina a niveles cercanos a sus respectivos LMRs.

- Implementación del sistema microbiológico Resscreen® en el tambo: La aplicación de este sistema para el análisis de residuos de antibióticos en la leche procedente de vacas tratadas con sulfadoxina/trimetoprim, tilosina, amoxicilina u oxitetraciclina permite realizar un seguimiento individual de cada animal y decidir el destino de la leche, de modo tal que, aquellos animales que producen leche libre de sustancias inhibitoras puedan incorporarse al grupo de vacas en ordeño, mientras que la leche de aquellas vacas que contienen residuos con acción inhibitoria deberá desecharse. De este modo, el productor puede disponer de un método simple, fiable, fácil de usar y de bajo costo que puede implementarse en el tambo dentro de un Sistema de Control de

Puntos Críticos, que le permita al productor garantizar la inocuidad de la leche de su explotación

Este sistema microbiológico podría utilizarse en forma rutinaria para el control de residuos en leche procedente de animales individuales tratados, a fin de disminuir la frecuencia de aparición de residuos de antibióticos en la leche, contribuyendo de este modo a mejorar la inocuidad de la leche y los productos lácteos desde su inicio en la cadena alimenticia, es decir desde el propio tambo.

VII. BIBLIOGRAFIA

Adams, H. 2003. Farmacología y terapéutica veterinaria. Ed. Acribia. Zaragoza, España.

Agresti, A. 1990. Categorical Data Analysis. Ed. John Wiley and Sons. U.K.

Althaus, R. L.; Molina, P.; Zorraquino, M., Peris, C.; Fernandez, N.; Rodriguez, M. 1999. Evaluation of selection antibiotic residue screening test in milk samples from individual Manchega ewes in Milking and Milk production of dairy sheep and goats. Pp. 164-167. Wageningen Pers Publ. Wageningen, Netherlands.

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

Althaus, R.; Peris, C.; Montero, A.; Torres, A.; Molina, M. P.; Fernandez, N. 2002. Detection limits of antimicrobial agents in ewe milk by Delvotest®. *Milchwissenschaft*, 57: 660-664.

Althaus, R.; Molina, M. P.; 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.

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.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 2000. Official Methods of Analysis. 33: 39-44. 17Th edition. Ed. AOAC. Arlington.

- Archimbault, P. 1983. Persistence in milk of active antimicrobial intramammary substances. Proceedings of the 2nd Symposium of the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology. Toulouse, 1982.
- Beukers, R. 1991. Some special aspects of Delvotest[®]. 20-23. In Inhibition substances in milk-current Analytical Practic. IDF Bull. N° 283. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica.
- Bevil, R. 1989. Sulfonamide residues in domestic animals. J. Vet. Phar. Ther., 12: 241-246.
- Botsoglou, N.; Fleutoris, J. 2001. Drugs residues in foods: Pharmacology, food safety, and analysis. Ed. Marcel Dekker. New York.
- 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.
- Brady, M.; Katz, S. 1988. Antibiotic/antimicrobial residues in milk. Journal of Food Protection, 51: 8-11.
- 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.
- Bywater, R. 2004. Veterinary use of antimicrobials and emergence of resistance in zoonotic and sentinel bacteria in the EU. J. Vet. Med. 51: 361-363.
- CAA (Código Alimentario Argentino). 2001. Capítulo VII: Alimentos Lácteos (artículos 553-642). Decreto 2126/71 del Código Alimentario Argentino.
- CEE (Comunidad Económica Europea). 1990. Reglamento 2377/90/CEE del Consejo, de 26 de junio de 1990, por el que se establece un procedimiento comunitario de

fijación de los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal. Diario Oficial n° L 224: 1-8.

CEE (Comunidad Económica Europea). 1992a. Directiva 46/92/CEE del Consejo del 16 de Junio de 1992, por la que se establecen las normas sanitarias aplicables a la producción y comercialización de leche cruda, leche tratada térmicamente y productos lácteos. Diario Oficial n° L 268, 18-24.

CEE (Comunidad Económica Europea). (992b. Reglamento 675/92 de la comisión de 18 de marzo de 1992 por el que se modifican los Anexos I y III del Reglamento (CEE) no 2377/90 del Consejo que establece un procedimiento comunitario de fijación de los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal. Diario Oficial, n° L 073, 8-14.

CEE (Comunidad Económica Europea). 1992c. Reglamento 3093/92 de la comisión de 27 de octubre de 1992 por el que se modifica el Anexos III del Reglamento (CEE) n° 2377/90 del Consejo que establece un procedimiento comunitario de fijación de los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal. Diario Oficial, n° L 311, 18-19.

CEE (Comunidad Económica Europea). 1994. Directiva 71/94/CEE del Consejo de 13 de diciembre de 1994 por la que se modifica la Directiva 92/46/CEE por la que se establecen las normas sanitarias aplicables a la producción y comercialización de leche cruda, leche tratada térmicamente y productos lácteos. Diario Oficial n° L 368, 33-37.

CEE (Comunidad Económica Europea). 1996. Directiva 23/96 del Consejo, de 29 de abril de 1996, relativa a las medidas de control aplicables respecto de determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos y por la que se derogan las Directivas 85/358/CEE y 86/469/CEE y las Decisiones 89/187/CEE y 91/664/CEE. Diario Oficial n° L 125, 10-32.

CEE (Comunidad Económica Europea). 2002. Decisión 2002/657/ del Consejo del 12 de Agosto de 2002 por la que se aplica la Directiva 23/96 del consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados. Diario Oficial nº L 73, 30-31.

CEE (Comunidad Económica Europea). 2010. Reglamento 37/2010 del Consejo del 22 de diciembre 2009 relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere a los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal. Diario Oficial, nº L 15, 1-72.

Charm, S.; Ruth, G. 1993. Advances in Charm technology for Antimicrobial residues in milk. 32-46. In Inhibitory substances in milk-current analytical practice. IDF Bull. Nº 283. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica.

Charm, S.; Zomer, E. 1995. The evolution and direction of rapid detection/identification of antimicrobial drug residues. 224-233. In Residues of Antimicrobial Drugs and Other Inhibitors in Milk. IDF S. I. Nº 9505. International Dairy Federation. Bruselas, Belgica.

Cinquina, A.; Longo, F.; Anastasi, G.; Giannetti, L.; Cozzani, R. 2003. Validation of high-performance liquid chromatography method for the determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycyline in bovine milk and muscle. J. Chromatogr. 987: 227-233.

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.

Debackere, 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, 243 p.

Del Prato, O. 1997. Gli inibenti nel latte e i loro effetti sulle trasformazioni casearie. *Il Latte*, 22 (7): 40-48.

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.

Erskine, R.; Wagnerr, S.; De Graves, F. 2003. Mastitis therapy and pharmacology. *Vet. Clin. Food Anim.*, 19: 109-138.

Fabre, J. M.; Moretain, J. P.; Ascher, F.; Brouillet, O.; Berthelot, X. 1995. Main causes of inhibitors in milk a survey in one thousand french dairy farms. 27-31. In residues of antimicrobial Drugs and Other Inhibitors in milk. IDF S. I. N° 9505. International Dairy Federation. Bruselas, Belgica.

FDA (Food and Drug Administration). 1997. Anexo 5: HACCP Guidelines. In FDA Food code. The United States Food and Drug administration. Disponible en: <http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/RetailFoodProtection/FoodCode/FoodCode1999/UCM054672>

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. M-I-96-10 Revision #3. Tables listing equivalent beta-lactam tests. Disponible en: <http://www.cdffa.ca.gov/ahfss/mdfc/pdfs/mi-96-10.pdf>.

FIL-IDF (Federación Internacional de Lechería). 1991. Detection and confirmation of inhibitors in milk and milk products. IDF Bull. N° 258. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica.

FIL-IDF (Federación Internacional de Lechería). 1997. Guidance for the standardized description of microbial inhibitor test. IDF Grup E-503. Antibiotics, Appendix 3: 1-16.

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

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

Gardner, I.; Cullor, J.; Galey, F.; Sischo, W.; Salman M.; Slenning, 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.

Gruet, P.; Maincent, P.; Berthelot, X.; Kaltsatos, V. 2001. Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspectives. Adv. Drug Delivery Rev. 50: 245-259.

Heeschen, W.; Blüthgen, A. 1991. Current problems of chemical residues and contaminan. In Special addresses at IDF annual sessions. IDF Bull. N° 272. International Dairy Federation. Bruselas, Belgica.

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

- Heeschen, W.; Blüthgen, A. 1995. Veterinary drugs and pharmacologically active compounds. 16-39. In Residues and contaminants in milk products. IDF S. I. N° 9101. International Dairy Federation. Bruselas, Belgica.
- Heeschen, W. H. 1996. Integrated detection systems for antimicrobials in milk: the IDF approach. Mastitis Newsletter 21, Newsletters of the IDF-FIL N° 144: 3-6.
- Heeschen, W. 1997. Factores determinantes de la calidad e higiene de le leche”. XIV Jornadas de Técnicos y Especialistas en Mamitis y Calidad de la Leche. Palma de Mallorca, España, 30 de octubre de 1997: 21 pp.
- Honkanen-buzalski, T., Reybroeck, W. 1995. Antimicrobials. Proceeding of the IDF-Symposium. Kiel, Germany. 343 p.
- Honkenen-Buzalski, T.; Reybroeck, W. 1997. Antimicrobials. 26-34. In Residues and contaminants in milk and milk products. IDF S. I. n° 9701. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica.
- IFAH (International Federation for Animal Health). 2006. Improving the quality of life for animals and people. Annual Report. IFAH. Bruselas, Bélgica.
- 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, 8 pp.
- 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.
- Kelly, W. 1982. Qualitative ampule and multitest for betalactam residues in fluid milk products: colaaborative study. J. Assoc. Offic. Anal. Chem. 65: 1193.
- Lacroix, D. 1995. Le dépistage des antibiotiques à la ferme le producteur de lait québécois. Le Producteur de lait Québécois: 30–31.

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.

Löscher, W. 1994. Animal experiments in the development and evaluation of veterinary drugs. *Tierärztliche-Umschau*. 49: 67-68.

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.

Luitz, M.; Suhren, G. 1996. Nachweis von tetracyclinen in milch mit verschiedenen modifikationen des brillant-schwarzreduktionsteststs und dem Delvotest SP. *DMZ, Lebensmittelindustrie und Milchwirtschaft.* ,117 (21): 1010-1015.

Macri, A.; Mantovani, A. 1995. The safety evaluation of residues of veterinary in farm animal tissues and products. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 14 (2): 119-129.

Marco, J.; García, I.; Zigorraga, C.; Molinero, M.; Azapiri, M. 2001. Evolución del uso de antimicrobianos en el tratamiento de enfermedades del ganado vacuno lechero y presencia de residuos inhibidores en leche de vaca cruda y tratada térmicamente. 1-8. Jornada Técnica sobre el uso de antimicrobianos en medicina veterinaria y sus posibles repercusiones en la salud pública. Bilbao, Portugal.

Mateos, P. F. 2002. Agentes antimicrobianos y microorganismos. Curso de microbiología. *Ingeniería de Alimentos*. <http://geocities.com/CollegePark/Lab/2960/Mic20.html>

Mendez, A.; Fernández, G.; Díaz, A.; Marco, J. 1999. Tratamiento de las mastitis bovinas. *Bovis*. 86: 49-75.

Merck & CO. 2000. El manual Merck de Veterinaria. 5ª ed. Ed. Océano. Barcelona.

- Miller, R.; Dowlen, H.; Norman, H. 1995. Relationship of sire's Predicted Transmitting Ability for milk somatic cell score (PTASCS) to daughters' incidence of clinical mastitis. *J. Dairy Sci.*, 78 (Suppl. 1): 175.
- Molina, M. P.; 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.
- Montero, A.; Althaus, R.; Molina, A.; Berruga, I.; Molina, M. 2005. Detection of antimicrobial agents by specific microbiological method (Eclipse 100) for ewe milk. *Small Rum. Res.*, 57: 229-237.
- Moretain, J. P. 1996. Elimination des médicaments vétérinaires dans le lait. Conferencia en XIII Reunión de especialistas en control de mamitis y calidad de leche (G-Temcal). Pamplona.
- Mourot, D.; Loussouarn, S. 1981. Sensibilité des ferments lactiques aux antibiotiques utilisés en médecine vétérinaire. *Rec. Med. Vét.*, 157: 175-177.
- 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, 12/09/2009, 271 pp.
- Nagel, O.; Zapata, M.L.; Basílico, J.C.; Molina, P.; 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. G.; Molina, M. P.; Althaus, R.L. 2011. Microbial system for identification of antibiotic residues in milk. Journal of Food and Drug Analysis, 19 (3): 369-375.

Oda, T.; Hiwaki, H. 1996. Heat stability of 24 antibiotics in food extracts. J. Food. Hyg. Soc. Japan, 37: 97-103.

Rang, H.; Dale, M.; Ritter, J. 2000. Quimioterapia de enfermedades infecciosas y malignas. 742-748. In Farmacología, 4ª ed. Ed Harcourt. Madrid.

Reichmuth, J.; Shuren, G.; Beukers, R. 1997. Evaluation of microbial inhibitor test- the IDF approach. Milchwissenschaft, 52: 691-695.

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.

Sarmah, A.; Meyer, M.; Boxall, A. 2006. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. Chemosphere, 65: 725-759.

Sawant, A.; Sordillo, L.; Jayarao, B. 2005. A survey on antibiotic usage in dairy herds in Pennsylvania. J. Dairy Sci., 88: 2991-2999.

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

SENASA (Servicio de Sanidad y Calidad Agroalimentaria). 2000. Normativa UE Tambos UE4, UE5, UE6. Parte de Supervisión. pp. 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.

Sischo, W.; Burns, C. 1993. Field trial of four cowside antibiotic residue screening test. JAVMA, 202: 1249-1254.

Sischo, W. 1996. The issue of testing quality. Symposium drug residue avoidance. J. Dairy Sci., 79: 1065-1073.

Smink, D. 1979. A standard test for the detection of antibiotic residues in milk. North European Dairy J., 3: 7-8.

Statgraphics. 2008. Statgraphics Centurion XV, statistics version 15.2.06. StatPoint, Inc.

Sternesjo, A.; Johnsson, G. 1998. A novel rapid enzyme immunoassay (Flurophos Beta screen) for detection of β -lactam residues in exfarm raw milk. J. Food Prot., 61: 808-811.

Suhren, G.; Reichmuth, J.; Walte, H. 1996. Detection of β -lactam antibiotics in milk by the penzym-test. Milchwissenschaft, 51: 269-273.

Suhren, G.; Beukers, R.; Reichmuth, J. 1997. Guidance for the standardized description of microbial inhibitor test. Reporte IDF 16 pp. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica.

- Suhren, G.; Heeschen, W. 1993. Detection of tetracyclines in milk by a *Bacillus cereus* microtitre test with indicator. *Milchwissenschaft*, 48: 259-263.
- Sumano, H.; Ocampo L. 1997. Quimioterapia de las enfermedades microbianas. 118.-137. In *Farmacología Veterinaria*, 2ª ed. Ed. McGraw-Hill Interamericana. Madrid.
- Tarabla, H., Calvino, L. 2008. Uso de antimicrobianos en mastitis bovina. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). *Disponible en: <http://inta.gob.ar/documentos/uso-de-antimicrobianos-en-mastitis-bovina/>*, consultado 16 de diciembre de 2011.
- 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.
- Van Os, J.; Beukers R. 1980. A multitest system for detection of antibiotics in milk. *J. Food Prot.*, 43: 510-511.
- Veterindustria. 2006. Guía de productos zoonos sanitarios 2005-2006. 9ª ed. Ed. Veterindustria. Madrid, España.
- 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.
- Zhao, F.; Zhang, X.; Gan, Y. 2004. Determination of tetracyclines in ovine milk by high-performance liquid chromatography with a coulometric electrode array system. *J. Chromatogr. A.*, 1055: 109-114.
- 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 mamitis y calidad de leche. Pamplona, España. 25 de octubre de 1996.

Zorraquino, M. 1997. Niveles de residuos de medicamentos veterinarios en leche por debajo de los límites máximos de residuos de la UE. XIV Jornadas del Grupo de Técnicos especialistas en Mamitis y Calidad de la Leche. Palma de Mallorca, España.

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

Zorraquino, M.; Berruga, M. I.; Solaz, T. 2003. Análisis de las técnicas de detección de residuos de medicamentos veterinarios en la leche cruda y sistema de control. Informe Técnico. Federación Industrias Lácteas Españolas (INLAC). Madrid.

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

Zorraquino, M.; Berruga, M.; Molina, M. 2007. Investigación de campo de los antibióticos (principio activo-formulación) utilizados en vacuno de leche en España y patología tratada. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid, España. pp. 73.

Zorraquino, M. 2008. Investigación de campo sobre tratamientos antimicrobianos en vacuno de leche en procesos patológicos no mamíticos. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid, España. pp. 8.

Zorraquino, M. A.; Roca, M.; Castillo, M.; Althaus, R.; Molina, M. P. 2008. Effect of thermal treatments on the activity of quinolones in milk. *Milchwissenschaft*, 63 (2): 192-195.

Zorraquino, M. A.; Roca, M.; Fernandez, N.; Molina, M. P., Althaus, R. 2009a. Heat inactivation of beta lactam antibiotics in milk. *Journal of Food Protection*, 71 (6): 1193-1198.

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

Zorraquino, M. A.; Althaus, R. L.; Roca, M., Molina, M. P. 2010. Heat treatment effects on the antimicrobial activity of macrolide and lincosamide antibiotics in milk. *Journal of Food Protection*, En Prensa.

Zwald, A.; Ruegg, P.; Kaneene, J.; Warnnick, L.; Wells, S.; Fossler, C.; Halbert, L. 2004. Management practices and reported antimicrobial usage on conventional and organic dairy farms. *J. Dairy Sci.*, 87: 191-201.