



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

MAESTRÍA EN CIENCIAS VETERINARIAS  
MENCION EN SALUD ANIMAL

BIOENSAYO QUE EMPLEA *Geobacillus thermoleovorans* COMO BACTERIA-  
TEST PARA LA DETECCIÓN DE RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS EN LA LECHE

Autor:

M.V. Selva Marina Itatí Machado

TESIS DE MAESTRIA EN CIENCIAS VETERINARIAS

Esperanza, 2016



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

MAESTRÍA EN CIENCIAS VETERINARIAS  
MENCION EN SALUD ANIMAL

BIOENSAYO QUE EMPLEA *Geobacillus thermoleovorans* COMO BACTERIA-  
TEST PARA LA DETECCIÓN DE RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS EN LA LECHE

Autor: Selva Marina Itatí Machado

TESIS DE MAESTRIA

Director Dr. Orlando Guillermo Nagel

Coodirector Dr. Rafael Lisandro Althaus

Miembros del Tribunal de Tesis Dr. José Di Conza

Dr. Diego Díaz David

Dr. Jorge Reinheimer

Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias Veterinarias

Esperanza, 2016

## **DEDICATORIA**

A quienes confiaron y creyeron en mí.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Proyecto PICT 368/2012 de la AGENCIA NACIONAL DE PROMOCION CIENTIFICA Y TECNOLOGICA del MINISTERIO DE CIENCIA, TECNOLOGÍA E INNOVACION PRODUCTIVA y CAID 50120110100575LI (Res CS 205/2013) de la UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL.

A Orlando Nagel y Rafael Althaus, por el tiempo, enseñanzas, paciencia, respeto y dedicación.

A Diego, Juan Pablo y Agustín, por su inmenso amor y comprensión.

A mis familiares y amigos, quienes me alentaron, acompañaron y ayudaron incondicionalmente.

A mis compañeros de la Facultad de Ciencias Veterinarias, por su colaboración.

## ÍNDICE GENERAL

I.	Introducción.....	1
I.1.	Hipótesis.....	3
I.2.	Objetivos.....	4
I.2.1.	Objetivos específicos.....	4
II.	Revisión bibliográfica.....	5
II.1.	Producción de leche Argentina.....	5
II.2.	Antibióticos de uso frecuente en la terapéutica de los rodeos lechero.....	8
II.2.1.	Betalactámicos.....	11
II.2.2.	Aminoglucosidos.....	14
II.2.3.	Macrólidos.....	15
II.2.4.	Quinolonas.....	16
II.2.5.	Tetraciclinas.....	18
II.2.6.	Sulfamidas.....	20
II.2.7.	Lincosamidas.....	21
II.3.	Eliminación de antibióticos en leche.....	22
II.3.1.	Efectos sobre el consumidor.....	22
II.3.2.	Industria.....	23
II.3.3.	Ambiente.....	23
II.3.4.	Pérdidas económicas al productor.....	24
II.4.	Aspectos legales.....	25
II.4.1.	Legislación en Argentina.....	26
II.4.2.	Métodos de screening utilizados para la detección de antibióticos en leche.....	29
III.	Materiales y métodos.....	34
III.1	Estudio I: límites de detección del bioensayo en placa de Petri que utiliza <i>G thermoleovorans</i> .....	34
III.1.1.	Disoluciones de fármacos y muestras fortificas.....	34
III.1.2.	Diseño experimental.....	36
III.1.3.	Bioensayo de inhibición microbiológico en placas de petri.....	37
III.1.3.1.	Equipos, reactivos y materiales.....	37
III.1.3.2.	Preparación de las suspensiones bacterianas a partir de cepas liofilizadas de formas esporuladas.....	38
III.1.3.3.	Preparación del bioensayo en la placa de Petri.....	40
III.1.3.4.	Interpretación de los resultados.....	40
III.1.3.5.	Análisis estadístico de los resultados.....	41
III.2	Estudio II: bioensayo que utiliza <i>G. thermoleovorans</i> en microplacas de titulación.....	41
III.2.1.	Efecto de la concentración de esporas sobre el límite de detección de penicilina en leche y el tiempo de respuesta.....	41
III.2.1.1.	Preparación de microplacas.....	41
III.2.1.2.	Análisis estadístico de los resultados.....	42
III.2.2.	Efecto de la concentración de ácido clavulánico sobre los límites de detección de penicilina en leche.....	43
III.2.2.1.	Preparación del bioensayo.....	43

III.2.2.2.	Análisis estadístico de los resultados.....	43
III.2.2.3.	Propiedades del bioensayo que utiliza <i>G. thermoleovorans</i> .....	44
IV.	Resultado y discusión.....	47
IV.1.	Estudio I: Bioensayo de difusión radial en Placas de Petri con <i>G. thermoeleovorans</i> .....	47
IV.1.1.	Detección de penicilinas.....	47
IV.1.2.	Detección de cefalosporinas.....	51
IV.1.3.	Detección de aminoglucósidos.....	54
IV.1.4.	Detección de macrólidos y lincomicina.....	57
IV.1.5.	Detección de quinolonas.....	61
IV.1.6.	Detección de tetraciclinas.....	64
IV.1.7.	Detección de sulfamidas.....	66
IV.2.	Estudio II: Bioensayo que utiliza <i>G. thermoleovorans</i> en microplacas de titulación.....	67
IV.2.1.	Efecto de la concentración de esporas sobre el límite de detección de penicilina en leche y el tiempo de respuesta.....	67
IV.2.2.	Efecto de la concentración de ácido clavulánico sobre los límites de detección de penicilinas en leche.....	69
IV.2.3.	Propiedades del bioensayo que utiliza <i>G. thermoleovorans</i> .....	74
IV.2.3.1.	Especificidad.....	74
IV.2.3.2.	Límites de detección del bioensayo <i>G. thermoleovorans</i> .....	75
IV.2.3.2.1	Betalactámicos.....	75
IV.2.3.2.2	Aminoglucosidos.....	80
IV.2.3.2.3	Macrólidos.....	82
IV.2.3.2.4	Quinolonas.....	84
IV.2.3.2.5	Tetraciclinas.....	86
IV.2.3.2.6	Sulfamidas.....	88
V.	Conclusión.....	89
VI.	Bibliografía.....	91

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Cantidad de tambos por cuenca y representatividad nacional.....	5
Tabla 2.	Participación porcentual de la producción provincial por períodos cronológicos.....	6
Tabla 3.	Clasificación de los diferentes agentes antimicrobianos.....	10
Tabla 4.	Límites máximos de residuos (LMRs) establecidos por el Codex Alimentarius, Unión Europea y tolerancia en USA de antimicrobianos en leche.....	27
Tabla 5.	Límites de detección ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) de diferentes métodos de inhibición microbiológica.....	32
Tabla 6.	Antimicrobianos y disolventes empleados en el estudio I.....	35
Tabla 7.	Concentraciones de sustancias antimicrobianas.....	36
Tabla 8.	Concentraciones de penicilinas en leche utilizadas para la optimización del bioensayo que emplea <i>G. thermoleovorans</i> .....	43
Tabla 9.	Concentraciones de agentes antimicrobianos utilizadas para la determinación de los límites de detección del bioensayo que utiliza <i>G. thermoleovorans</i> .....	46
Tabla 10.	Valores medios y desviaciones estándares de los diámetros de los halos inhibitorios de penicilinas en leche medidos con <i>G. thermoleovorans</i> . ....	48
Tabla 11.	Coeficientes del modelo de regresión que expresa el efecto de las concentraciones de penicilinas en leche sobre los diámetros de los halos inhibitorios medidos con <i>G. thermoleovorans</i> .....	49
Tabla 12.	Concentraciones de penicilinas en leche que producen un incremento de 2 mm en los radios inhibitorios de <i>G. thermoleovorans</i> .....	50
Tabla 13.	Valores medios y desviaciones estándares de los diámetros de los halos inhibitorios de cefalosporinas en leche medidos con <i>G. thermoleovorans</i> .....	52
Tabla 14.	Coeficientes del modelo de regresión que expresa el efecto de las concentraciones de cefalosporinas en leche sobre los diámetros de los halos inhibitorios medidos con <i>G. thermoleovorans</i> .....	52
Tabla 15.	Concentraciones de cefalosporinas en leche que producen un incremento de 2 mm en los radios inhibitorios de <i>G. thermoleovorans</i> .....	54
Tabla 16.	Valores medios y desviaciones estándares de los diámetros de los halos inhibitorios de aminoglucósidos en leche medidos con <i>G. thermoleovorans</i> .....	55
Tabla 17.	Coeficientes del modelo de regresión que expresa el efecto de las concentraciones de aminoglucósidos en leche sobre los diámetros de los halos inhibitorios medidos con <i>G. thermoleovorans</i> .....	56
Tabla 18.	Concentraciones de aminoglucósidos en leche que producen un incremento de 2 mm en los radios inhibitorios de <i>G. thermoleovorans</i> .....	57
Tabla 19.	Valores medios y desviaciones estándares de los diámetros de los halos inhibitorios de macrólidos y lincomicina en leche medidos con	58

	<i>G. thermoleovorans</i> .....	
Tabla 20.	Coefficientes del modelo de regresión que expresa el efecto de las concentraciones de macrólidos y lincomicina en leche sobre los diámetros de los halos inhibitorios medidos con <i>G. thermoleovorans</i> .....	59
Tabla 21.	Concentraciones de macrólidos y lincomicina en leche que producen un incremento de 2 mm en los radios inhibitorios de <i>G. thermoleovorans</i> .....	60
Tabla 22.	Valores medios y desviaciones estándares de los diámetros de los halos inhibitorios de quinolonas en leche medidos con <i>G. thermoleovorans</i> .....	62
Tabla 23.	Coefficientes del modelo de regresión que expresa el efecto de las concentraciones de quinolonas en leche sobre los diámetros de los halos inhibitorios medidos con <i>G. thermoleovorans</i> .....	62
Tabla 24.	Concentraciones de quinolonas en leche que producen un incremento de 2 mm en los radios inhibitorios de <i>G. thermoleovorans</i> .....	63
Tabla 25.	Valores medios y desviaciones estándares de los diámetros de los halos inhibitorios de tetraciclinas en leche medidos con <i>G. thermoleovorans</i> .....	64
Tabla 26.	Coefficientes del modelo de regresión que expresa el efecto de las concentraciones de tetraciclinas en leche sobre los diámetros de los halos inhibitorios medidos con <i>G. thermoleovorans</i> .....	65
Tabla 27.	Concentraciones de tetraciclinas en leche que producen un incremento de 2 mm en los radios inhibitorios de <i>G. thermoleovorans</i> .....	66
Tabla 28.	Efecto del Log [E] sobre los límites de detección de penicilina en leche y el tiempo de respuesta.....	68
Tabla 29.	Valores de $\chi^2$ y probabilidad para los diferentes factores que afectan la respuesta de los bioensayos elaborados con CAP para la detección de tetraciclinas.....	70
Tabla 30.	Ecuaciones logísticas de las curvas dosis-respuestas de betalactámicos para los bioensayos preparados con diferentes niveles de "ACLAV"	71
Tabla 31.	Efecto de la concentración de ACLAV en el bioensayo sobre los límites de detección de betalactámicos en leche.....	74
Tabla 32.	Parámetros estadísticos de los componentes químicos de la leche.....	74
Tabla 33.	Efecto de la concentración de ácido clavulánico en el medio de cultivo sobre la selectividad de los bioensayos.....	75
Tabla 34.	Coefficientes del modelo de regresión logística para las curvas dosis respuestas de las frecuencias relativas del Bioensayo GT utilizado con antibióticos betalactámicos en leche.....	76
Tabla 35.	Límites de detección de antibióticos betalactámicos en leche mediante el Bioensayo GT.....	77
Tabla 36.	Coefficientes del modelo de regresión logística para las curvas dosis respuestas de las frecuencias relativas del Bioensayo GT utilizado con aminoglucósidos en leche.....	80
Tabla 37.	Límites de detección de antibióticos aminoglucósidos en leche	81



	mediante el Bioensayo GT.....	
Tabla 38.	Coefficientes del modelo de regresión logística para las curvas dosis respuestas del Bioensayo GT utilizado con macrólidos en leche.....	82
Tabla 39.	Límites de detección de macrólidos en leche mediante el bioensayo GT.....	83
Tabla 40.	Coefficientes del modelo de regresión logística para las curvas dosis respuestas del Bioensayo GT utilizado con quinolonas en leche.....	84
Tabla 41.	Límites de detección de quinolonas en leche mediante el bioensayo GT.....	85
Tabla 42.	Coefficientes del modelo de regresión logística para las curvas dosis respuestas del Bioensayo GT utilizado con tetraciclinas en leche.....	86
Tabla 43.	Límites de detección de tetraciclinas en leche mediante el bioensayo GT.....	87

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Cantidad de unidades productivas, producción de leche y cabezas distribuidas por provincias en Argentina (MAGyP 2013).....	7
Figura 2.	Diseño experimental empleado para estudiar las concentraciones mínimas inhibitorias en leche.....	37
Figura 3.	Efecto de las concentraciones de penicilinas ( $\mu\text{g/l}$ ) en leche sobre los diámetros de los halos inhibitorios (mm) del bioensayo en placas de Petri que emplea <i>G. thermoleovorans</i> .....	50
Figura 4.	Efecto de las concentraciones de cefalosporinas ( $\mu\text{g/l}$ ) en leche sobre los diámetros de los halos inhibitorios (mm) del bioensayo en placas de Petri que emplea <i>G. thermoleovorans</i> .....	54
Figura 5.	Efecto de las concentraciones de aminoglucósidos ( $\mu\text{g/l}$ ) en leche sobre los diámetros de los halos inhibitorios (mm) del bioensayo en placas de Petri que emplea <i>G. thermoleovorans</i> .....	56
Figura 6.	Efecto de las concentraciones de macrólidos y lincomicina ( $\mu\text{g/l}$ ) en leche sobre los diámetros de los halos inhibitorios (mm) del bioensayo en placas de Petri que emplea <i>G. thermoleovorans</i> .....	60
Figura 7.	Efecto de las concentraciones de quinolonas ( $\mu\text{g/l}$ ) en leche sobre los diámetros de los halos inhibitorios (mm) del bioensayo en placas de Petri que emplea <i>G. thermoleovorans</i> .....	63
Figura 8.	Efecto de las concentraciones de tetraciclinas ( $\mu\text{g/l}$ ) en leche sobre los diámetros de los halos inhibitorios (mm) del bioensayo en placas de Petri que emplea <i>G. thermoleovorans</i> . ....	65
Figura 9.	Efecto de la concentración de esporas sobre la curva dosis-respuesta de penicilina en leche analizadas mediante el bioensayo ( <i>G. thermoleovorans</i> ) .....	67
Figura 10.	Efecto de la concentración de esporas sobre el límite de detección de penicilina en leche utilizando un bioensayo con <i>G. thermoleovorans</i> ...	68
Figura 11.	Efecto de la concentración de esporas sobre el tiempo de respuesta de bioensayo con <i>G. thermoleovorans</i> utilizado para la detección de penicilina en leche.....	69
Figura 12.	Curvas dosis-respuesta de los antibióticos betalactámicos para diferentes concentraciones de ácido clavulánico en el medio de cultivo).....	72
Figura 12.	Curvas dosis-respuesta de los antibióticos betalactámicos para diferentes concentraciones de ácido clavulánico en el medio de cultivo	73
Figura 13.	Curvas dosis respuestas de penicilinas en leche analizadas por el Bioensayo GT. ....	76
Figura 14.	Curvas dosis respuestas de cefalosporinas de leche analizadas por el Bioensayo GT.....	77
Figura 15.	Curvas dosis respuestas de aminoglucósidos en leche analizadas por el Bioensayo GT.....	81
Figura 16.	Curvas dosis respuestas de macrólidos en leche analizadas por el	83

	Bioensayo GT.....	
Figura 17.	Curvas dosis respuestas de quinolonas en leche analizadas por el Bioensayo GT.....	85
Figura 18.	Curvas dosis respuestas de tetraciclinas en leche analizadas por el Bioensayo GT.....	87

## RESUMEN

La leche bovina representa el 78% de la producción mundial láctea, considerándose una actividad productiva muy importante debido al elevado y variado consumo de sus subproductos. En los últimos años, en Argentina se han priorizado el pago de calidad basado en parámetros higiénico-sanitarios (recuento de bacterias y células somáticas) además del control de los residuos de antibióticos en la leche. Todo ello constituye una medida de seguridad, tanto para los consumidores como para las empresas lácteas.

Por estos motivos, el objetivo del presente trabajo fue diseñar un bioensayo de inhibición microbiológica en microplacas de titulación que permita detectar residuos de antimicrobianos en la leche mediante el empleo de *Geobacillus thermoleovorans* como bacteria-test, que brinde una respuesta en un tiempo inferior a los actuales métodos microbiológicos comerciales.

En una primera etapa se calcularon los límites de detección en placas de Petri, posteriormente se diseñó un bioensayo en placas de microtitulación. El bioensayo contuvo medio Mueller Hinton (38 g/l, pH 8,5) fortificado con D-glucosa (10 g/l) y ácido clavulánico (6 mg/l) para mejorar la sensibilidad a las penicilinas, esporas de *Geobacillus thermoleovorans* ( $1,5 \cdot 10^9$  esp/ml) con una mezcla de indicadores de óxido reducción.

Se concluye que este bioensayo presenta una respuesta dicotómica en un breve tiempo (1:30 horas) y posee límites de detección cercanos a las CIM para detectar residuos de penicilinas (3 µg/l de amoxicilina, 4 µg/l de ampicilina, 80 µg/l de cloxacilina, 34 µg/l de oxacilina y 4 µg/l de penicilina), cefalosporinas (140 µg/l de ceftiofur), macrolidos (140 µg/l eritromicina, 110 µg/l de lincomicina, 47 µg/l de tilmicosina y 55 µg/l de tilosina) y neomicina (540 µg/l), no presentando adecuada sensibilidad para tetraciclinas, sulfamidas y quinolonas en leche.

**Palabras claves:** Antibióticos en leche, *Geobacillus thermoleovorans*, Bioensayo, Método microbiológico, Screening test.

## SUMMARY

Bovine milk represents 78% of world milk production, considering a very important productive activity due to the high and varied consumption of their products. In recent years, Argentina has been prioritized payment based quality health and hygiene (bacterial count and somatic cells) parameters beyond the control of antibiotic residues in milk. all this is a safety measure for both consumers and dairy firms. On these grounds the objective of this work was to design a bioassay of microbial inhibition in microtiter plates to detect antimicrobial residues in milk by using *Geobacillus thermoleovorans* as bacteria-test, which provides a response time less than the current commercial microbiological methods. In a first stage detection limits in Petri dishes were calculated, later a bioassay designed in microtiter plates. The bioassay contained Mueller Hinton broth (38 g / l, pH 8.5) fortified D-glucose (10 g / l) and clavulanic acid (6 mg / l) to improve the sensitivity to penicillins, *Geobacillus thermoleovorans* spores ( $1.5 \cdot 10^9$  sperm / ml) with a mixture of oxide reduction indicators.

It is concluded that this bioassay presents a dichotomous response in a short time (1:30 hours) and it has detection limits near the CIM residues of penicillins (3 g / l of amoxicillin, 4 mg / l ampicillin, 80 g / l of cloxacillin, 34 g / l of oxacillin and 4 g / l of penicillin), cephalosporins (140 g / l of ceftiofu), macrolides (140 mg / l erythromycin, 110 mg / l lincomycin, 47 g / l tilmicosin and 55 g / l of tylosin) and neomycin (540 ug / l), not presenting adequate sensitivity to tetracyclines, sulfonamides and quinolones in milk.

**Keywords:** Antibiotics in milk, *Geobacillus thermoleovorans*, Bioassay, microbiological method, Screening test.

## I. INTRODUCCIÓN

La producción mundial láctea se ha incrementado en la última década. En Argentina, esta evolución ha sido similar debido a mayor consumo de subproductos elaborados.

La evolución de la lechería de los últimos años se analiza mediante indicadores de balance lácteo, producción, consumo y comercio exterior (MAGyP 2014). Así, por ejemplo, el indicador de producción señala una tendencia del sector lácteo argentino en ocupar un lugar importante en los mercados mundiales de exportación, principalmente leche en polvo entera y quesos (FAO, 2012), mientras que el indicador de comercio exterior muestra una estabilidad en los volúmenes de exportación, puesto que se mantuvo aproximadamente constante (450 mil toneladas) desde el año 2011.

Por su parte, el indicador de consumo interno lácteo per cápita señala una fluctuación acorde a los cambios monetarios pasando de 230 litros en la década de los años 1990 a 180 litros durante la crisis económica del año 2001, para recuperarse a 210 litros en el año 2013 (MAGyP 2014).

En América del Sur, Argentina ocupa el segundo lugar en producción de leche con 10.4 millones de toneladas/año, luego de Brasil quien lidera con 29.1 millones de toneladas/año (FAO, 2010). En lo que respecta a mercado exterior, FAO (2013) destaca un comportamiento dinámico del mercado mundial puesto que las exportaciones fueron de 66,1 millones de toneladas de leche (o equivalente leche) en el año 2012, que se incrementaron a 68,8 millones de toneladas en el año 2013 y se estima que alcanzarán los 72,1 millones de toneladas para el año 2014.

Las inversiones tecnológicas realizadas, en los últimos años dentro del sector lácteo argentino, muestran una tendencia a ocupar un lugar importante en los mercados mundiales de exportación, especialmente en el sector de leche en polvo entera y elaboración de quesos (FAO, 2010). Esta tendencia se encuentra amenazada por la aparición de enfermedades infecciosas en el ganado bovino lechero, que traen aparejadas tanto una disminución en la capacidad de producción como también en la calidad de la leche. Por este motivo, el manejo sanitario debe ser eficiente a fin de evitar que los animales contraigan enfermedades que puedan perjudicar a la producción láctea.

Por su parte, la aplicación de tratamientos farmacológicos sobre el bovino lechero genera residuos que pueden eliminarse por la leche ordeñada y persistir durante cierto tiempo, tanto en los animales tratados como en los productos elaborados (Debackere, 1995; Pascal Sanders, 2005).

La presencia de antibióticos y sulfamidas en leche destinados al consumo, puede ocasionar diversos problemas; ya que estas sustancias no se destruyen con los tratamientos térmicos que se aplican en la industria láctea como la pasteurización y la esterilización (Zorraquino y col., 2003; Zorraquino, 2005).

Entre los riesgos que pueden producir los residuos se destacan: problemas toxicológicos para la salud de los consumidores (Debackere, 1995; Macri y Mantovani, 1995; Moretain, 1996; Heeschen, 1997), problemas en la fabricación de productos lácteos fermentados, como queso y yogurt (Berruga y col., 2007; Nawaz, y col., 2011) y de impacto medio-ambiental (Martinez-Carballo y col., 2007; Kemper, 2008).

Con motivo de evitar la aparición de estos problemas, la Comisión Reguladora de la CEE (Reglamento UE, 2010) ha definido los límites para la presencia de residuos de antibióticos de uso veterinario en leche.

Por su parte, la Unión Europea (CEE, 2002) clasifica los métodos analíticos para la detección de sustancias inhibitoras en leche en dos grupos: métodos de tipo cualitativo como los microbiológicos, enzimáticos, receptores proteicos, que brindan respuesta de tipo dicotómica y los métodos cuantitativos tales como HPLC-MS-MS, HPLC-DAD, entre otros.

Dentro las técnicas cualitativas se destacan los métodos de inhibición microbiológica, por ser rápidos, económicos. Por ello, numerosas empresas comerciales han desarrollado diversos métodos microbiológicos para la detección de residuos de antibióticos en la leche (Diserens y col., 2005; Toldra y Reig, 2006). Estos test se basan en la inhibición del crecimiento de una bacteria-test, entre las cuales se destaca *Geobacillus stearothermophilus* subsp. *calidolactis* utilizada en los métodos comerciales (Delvotest<sup>®</sup>, BRT<sup>®</sup> AiM, Eclipse<sup>®</sup> y Charm<sup>®</sup> AIM-96).

Estos métodos pueden detectar principalmente, la simple “presencia” o “ausencia” de residuos de antibióticos betalactámicos y sulfamidas en leche en un tiempo

aproximado de 3 horas, sin embargo, no poseen sensibilidad para la detección del resto de familias de antibióticos (tetraciclinas, aminoglucósidos, macrólidos y quinolonas).

Por ello, resulta conveniente investigar otros bioensayos que utilicen diferentes bacterias-test que permitan incrementar el número de antibióticos a detectar, o disminuir el tiempo de respuesta del método.

### **I.1. Hipotesis**

En lo que respecta a métodos microbiológicos de screening, se debe destacar que las actuales casas comerciales trabajan exclusivamente con *G. stearothermophilus*, y que los esfuerzos que estas empresas realizan a fin de disminuir el tiempo de respuesta, están centrados en efectuar lecturas cinéticas del crecimiento de esta bacteria test, para disminuir el tiempo que demanda en cambiar la coloración de los indicadores redox o ácido-base. De esta forma, las empresas logran reemplazar el cambio visual de un indicador, por lecturas fotométricas de la turbidimetría producida por la bacteria-test a dos tiempos distintos. Al respecto, algunas empresas como Gist-Brocades que comercializa el método Delvotest<sup>®</sup>, ha logrado disminuir el tiempo desde 3.00 horas a 2.15 – 2.30 horas. Sin embargo, esta aparente ventaja presenta como inconveniente la necesidad de utilizar un lector fotométrico diseñado y comercializado exclusivamente para este fin, que es el equipo “Delvotest<sup>®</sup> - Accelerator” que posee un elevado costo y que debe ser amortizado posteriormente.

La presente tesis se fundamenta en la hipótesis que los microorganismos termófilicos y esporulados, por desarrollarse en condiciones extremas de temperatura, rangos de pH y/o potencial redox, pueden presentar una actividad metabólica incrementada en comparación con otros microorganismos. Por ello, esta propiedad podría utilizarse como un beneficio en el momento de obtener una respuesta (ácido-base redox) por parte de estos microorganismos termófilicos, que se vería reflejado en una disminución en el tiempo de incubación y lectura del método de screening microbiológico, en comparación con los demás métodos microbiológicos, sin necesidad de requerir un equipamiento adicional para las lecturas de los resultados.



## **I.2.Objetivos**

### *I.2.1 Objetivo general:*

Fue diseñar y evaluar un bioensayo de inhibición microbiológica en placas de microtitulación, que permita detectar residuos de antimicrobianos en leche mediante el empleo de un microorganismo termófilo (*Geobacillus thermoleovorans*) con una respuesta dicotómica en un tiempo inferior a 3 horas, que resulte económico y fácil de implementar por las industrias y laboratorios lácteos encargados del control de calidad.

### *I.2.2 Objetivos específicos:*

- Determinar las concentraciones inhibitorias mínimas y los límites de detección de 26 antibióticos en leche mediante un método de difusión en placas de petri que emplea *Geobacillus thermoleovorans* como bacteria-test.

- Establecer la concentración óptima de esporas del bioensayo de modo tal de obtener una respuesta colorimétrica de tipo dicotómica (positivo-negativo) en un tiempo inferior a 3 horas.

- Evaluar el efecto de la incorporación de sustancias mejoradoras al medio de cultivo a fin de incrementar la sensibilidad del *Geobacillus thermoleovorans* hacia un número mayor de antimicrobianos en leche y a niveles exigidos por la legislación.

- Determinar las propiedades de límites de detección y selectividad del bioensayo de respuesta dicotómica.

## II. REVISION BIBLIOGRÁFICA

### II.1. Produccion de leche argentina

En Argentina, la producción láctea se concentra preferentemente en las provincias de Córdoba, Santa Fe, Buenos Aires, Entre Ríos y La Pampa, donde se ubican la mayoría de los tambos e industrias del sector lechero ([www.alimentosargentinos.gov.ar](http://www.alimentosargentinos.gov.ar))

La producción de leche del año 2012 es liderada por Córdoba (37%), seguida por Santa Fe (32%) y Buenos Aires (25%). Las restantes provincias productoras aportan en su conjunto el 6% del total nacional según tabla 1 (MAGyP, 2013).

**Tabla 1.** Cantidad de tambos por cuenca y representatividad nacional

Cuencas	Tambos por cuencas(unidad)	Total nacional	Tambos < 100 ha por cuenca	Total de cuencas
Sur Santa Fe	324	2,80%	110	33,95%
Centro Santa Fe	3471	29,90%	1453	41,86%
Norte Santa Fe	63	0,50%	41	65,08%
Abasto Sur Bs.As	812	7,00%	424	52,22%
Abasto Norte Bs.As	393	3,30%	205	52,16%
Oeste Bs.As	1036	8,92%	352	33,98%
Mar y Sierra Bs.As	182	1,57%	47	25,82%
Córdoba Norte	1977	17,01%	493	24,94%
Villa María Córdoba	1178	10,14%	285	24,19%
Sur Córdoba	353	3,04%	110	31,16%
Entre Ríos	610	5,25%	468	76,72%
La Pampa Centro				
Norte	62	0,53%	21	33,87%
La Pampa Sur	145	1,25%	25	17,24%
Bs.As Sur	145	1,25%	77	53,10%
SE Santiago del Estero	146	1,26%	13	8,90%
Trancas Tucumán	56	0,48%	17	30,36%
Valle De Lerma Salta	45	0,39%	9	20,00%
Este Misiones	416	3,58%	-	-
El Colorado Formosa	100	0,86%	-	-
Corrientes	106	0,91%	-	-

Fuente: Marino, y col (2011)

En Tabla 2 se muestra la participación porcentual de las cuatro principales provincias productoras de leche en tres períodos cronológicos sucesivos. Estos valores

reflejan una cierta tendencia productiva de cada provincia. Guiguet y col. (2011) concluyen que la provincia de Santa Fe ha retrocedido en el ranking nacional de producción de leche, resignando el primer lugar ante la provincia de Córdoba.

En su evolución, ambas provincias muestran similar tendencia hasta los primeros meses del 2007, cuando Córdoba sobrepasó a Santa Fe y mantuvo su hegemonía hasta el fin de la década. Por otro lado, Buenos Aires ha tenido una producción bastante estable desde 2005 y Entre Ríos, la cuarta en importancia, presenta un crecimiento sostenido desde el año 2003.

**Tabla 2.** Participación porcentual de la producción provincial por períodos cronológicos

<b>Períodos</b>	<b>Buenos Aires</b>	<b>Córdoba</b>	<b>Santa Fe</b>	<b>Entre Ríos</b>
Enero 2000 – Abril 2003	27,00%	35,10%	35,00%	2,90%
Mayo 2003 –Diciembre 2006	27,70%	33,90%	34,50%	3,90%
Enero2007-Diciembre2009	28,50%	35,50%	31,70%	4,30%

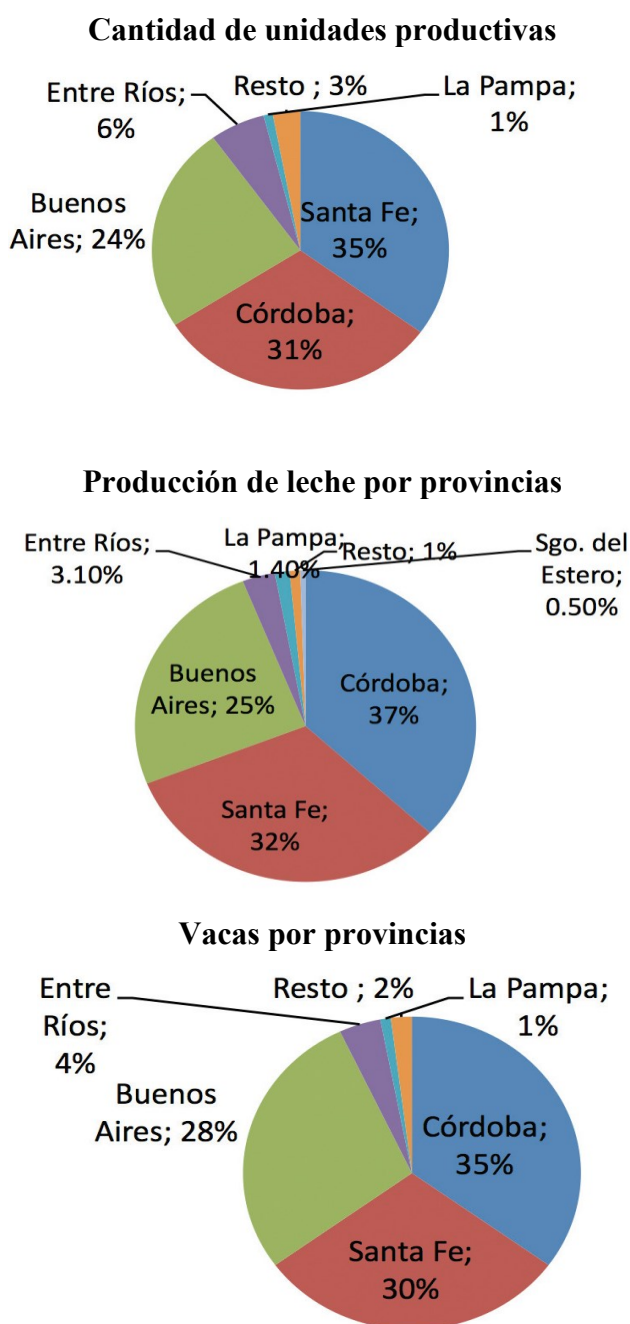
Fuente: Guiguet, et al (2011)

En Argentina la producción de leche es continua a diferencia de otros países donde es de tipo estacional; si bien sufre cierta estacionalidad relacionada a la oferta forrajera, debido a que la gran mayoría de las explotaciones son en base a sistemas pastoriles con suplementación sistemática según épocas del año (CREA, 2012).

La producción de leche de alta calidad e inocua fue lograda al cumplirse diferentes parámetros higiénico-sanitarios, como son el recuento de bacterias y de células somáticas. Los umbrales máximos para las bacterias se fijaron en (< 100.000 ufc/ml), mientras que para las células somáticas se estableció en (< 400.000 cel/ml). De este modo, se logró que la leche sea técnicamente procesable para la elaboración de productos derivados, acompañado del uso de tecnologías aplicadas como equipos de frío, ordeñadoras, detección temprana de animales con patologías, así como también control en el uso de medicamentos y leches con residuos, además de la capacitación a los tamberos y productores (MAGyP 2013).

En la Figura 1 se exponen las frecuencias de unidades productivas distribuidas por provincias. Se puede observar que las provincias de Santa Fe (35%), Córdoba (31%) y Buenos Aires (24%) contienen la mayoría de tambos. En dicha figura se muestra

además la producción láctea discriminada por provincias. Al igual que en el caso anterior, las provincias que mayor producción de leche poseen son Córdoba (37%), Santa Fe (32%), seguida por Buenos Aires (25%).



**Figura 1.** Cantidad de unidades productivas, producción de leche y cabezas distribuidas por provincias en Argentina (MAGyP 2013).

En forma similar, las provincias que tienen mayores unidades de vacas lecheras son Córdoba (45%), Santa Fe (30%) y Buenos Aires (28%), según datos reportados por el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca (MAGyP, 2013). Con respecto al destino de esta leche, la industria láctea tiene una fuerte concentración en el rubro de los quesos, seguido en orden de importancia por la leche en polvo y leche fluida, mientras que para los productos que se exportan, en primer lugar, está la leche en polvo, le sigue el suero, quesos y otros derivados. Los principales países importadores son Brasil, Venezuela, Chile, Estados Unidos, entre otros.

La tendencia a realizar inversiones tecnológicas, tanto en la producción primaria como en el área industrial se encuentra amenazada por la aparición de enfermedades infecciosas que requieren el uso de terapias medicamentosas (antimicrobianos, antiparasitarios, etc) en el ganado bovino lechero, lo que trae aparejado una disminución de la producción y calidad de leche (FAO 2010). Por este motivo, el manejo sanitario debe ser eficiente y así evitar que los animales enfermos perjudiquen a la producción.

## **II.2. Antibióticos de uso frecuente en la terapéutica de los rodeos lecheros**

El descubrimiento de la penicilina en el año 1928 fue uno de los hechos más relevantes en la historia de la farmacología, ya que se trata de una molécula para combatir a los procesos infecciosos. Desde ese momento, se iniciaron investigaciones y desarrollo de nuevas moléculas de antibióticos (Heeschen y Blüthgen, 1991). Entre las propiedades deseadas para un agente antibacteriano se destacan (Rang y col., 2000):

- Las características farmacocinéticas deben proporcionar altos valores de concentraciones en los lugares de acción y perdurar en el tiempo
- Baja toxicidad para el huésped
- No generar resistencias bacterianas
- Eficacia por vía tópica, oral o parenteral
- Alta penetrabilidad
- Estabilidad (no lábil)
- Fácil de producir en grandes cantidades y a bajo costo

Se debe destacar que resulta prácticamente imposible encontrar una molécula que reúna todas las características mencionadas anteriormente. Por ello, se recurre a

combinaciones de antimicrobianos para mejorar la efectividad de los tratamientos (Löscher y col., 1994).

Los antibióticos se definen en forma general como un producto del metabolismo microbiano que es capaz de inhibir o destruir el crecimiento de otros microorganismos y además resulta efectivo a bajas concentraciones (Mateos, 2002).

Las sustancias antimicrobianas, se pueden clasificar en:

**Bacteriostáticos:** son aquellos que inhiben el crecimiento de los microorganismos. Entre estos se encuentran macrólidos, tetraciclinas, cloranfenicol, etc.

**Bactericidas:** son causantes de la lisis o muerte bacteriana. En este grupo se incluyen los betalactámicos, aminoglucósidos, polipeptídicos, entre otros.

Además, existe otra clasificación de los antimicrobianos basada en su eficacia clínica, que está en relación con el espectro de los microorganismos que inhiben:

**Espectro reducido:** actúan sobre un número pequeño de gérmenes. Entre ellos se encuentran penicilinas naturales, aminoglucósidos y polipéptidos.

**Amplio espectro:** actúan sobre un gran número de microorganismos. A este grupo pertenecen las tetraciclinas y el cloranfenicol.

Aunque todos los sistemas de clasificación son válidos, el más utilizado por la comunidad científica es el que agrupa a estos compuestos por similitud química, según el núcleo base de sus estructuras, que les confieren cierta semejanza en sus propiedades físico-químicas y farmacológicas. En Tabla. 3 se presenta una clasificación de los agentes antimicrobianos realizada a partir de diferentes autores (Archimbault, 1983; Sumano y Ocampo, 1997; Merck y col., 2007) según sus similitudes estructurales.

Un sistema de clasificación basado en la biología celular, contempla los diversos mecanismos de acción de los agentes antimicrobianos clasificándolos en:

- Agentes que inhiben la síntesis de la pared celular de la bacteria: antibióticos betalactámicos, bacitracina, etc
- Sustancias que afectan a la permeabilidad de membranas: polimixinas, etc
- Agentes que inhiben la síntesis proteínica a nivel ribosomal: cloranfenicol, tetraciclinas, macrólidos, aminoglucósidos
- Fármacos que afectan el metabolismo de los ácidos nucleicos: rifampicina, etc
- Antimetabolitos que impiden la síntesis del ácido fólico, como sulfonamidas y los nitrofuranos

- Inhibidores de la topoisomerasa: quinolonas, fluoroquinolonas, etc

**Tabla 3.** Clasificación de los diferentes agentes antimicrobianos

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

En la práctica veterinaria es habitual el uso de medicamentos (Young, 1994; Cordiés Jackson y col., 1998), por ofrecer grandes beneficios que incluyen mejor salud animal, mayor producción y, en algunos casos, reducción de patógenos transmitidos por alimentos (Mathew y col., 2007). Para el ganado productor de leche, los antibióticos se utilizan principalmente en tratamientos curativos de infecciones microbianas. En los actuales sistemas de producción, se utilizan para el mantenimiento de un adecuado nivel productivo desde el punto de vista de la economía y la rentabilidad de las explotaciones ganaderas (Cancho Grande y col., 2000; Schwarz y col., 2001).

Según Viola y DeVincent (2006) y Mathew y col. (2007), a diferencia de la medicina humana, el empleo de antibióticos en animales productores de alimentos tiene tres objetivos principales:

- **Terapéutico:** tratamiento de animales enfermos
- **Metafilaxis:** tratamiento de animales clínicamente sanos
- **Profiláctico:** prevenir infecciones en los momentos de riesgo, como en el desleche

El uso terapéutico de antibióticos permite el tratamiento de las enfermedades infecciosas que afectan a los animales y tiene por objetivo destruir los agentes patógenos tan rápidamente como sea posible, causando un mínimo de efectos adversos para el animal (Schwarz y col 2001), contribuyendo así a mantener el control de la sanidad del rodeo en el tambo (Mathew y col., 2007).

Los antimicrobianos logran controlar las enfermedades, que pueden constituir el 80% de los problemas en las unidades de producción agropecuarias intensivas (Sarmah y col., 2006).

A continuación, se describirá brevemente cada uno de estos grupos de antimicrobianos:

### *II.2.1. Betalactámicos:*

Son sustancias relacionadas estructuralmente y en sus mecanismos de acción, diferenciándose en cuanto a su espectro antibacteriano y su farmacocinética.

El mecanismo de acción de los antibióticos betalactámicos se basa en impedir la formación de la pared de la célula bacteriana, inhibiendo la actividad de las transpeptidasas, enzimas que catalizan la formación de los enlaces peptídicos cruzados en la fase de unión de los polímeros a glucopéptido de la pared celular. (New, 1987; Thompson, 1987; Marín y Gudiol, 2003).



Las bacterias gram positivas y gram negativas presentan diferente sensibilidad a los antibióticos betalactámicos, dependiendo de las diferencias que existen en sus sitios receptores y a la cantidad de peptidoglucano presente en su pared celular, siendo mayor en las bacterias gram positivos que en las gram negativos.

Las penicilinas son bactericidas debido a su capacidad de inhibir la síntesis de la pared celular bacteriana y de activar enzimas que destruyen dicha pared. La ruptura del anillo betalactámico, que se produce por la acción de la penicilinasasa o la pérdida de la cadena lateral, por acción de una amidasa, llevan a la pérdida de la actividad antibacteriana (Botsoglou y Fletouris, 2001).

La mayoría de penicilinas, una vez administradas se distribuyen ampliamente por los líquidos y tejidos corporales al ser insolubles en lípidos, aunque no penetran en las células de los mamíferos (Rang y col., 2000). La mayor parte de estas penicilinas administradas por vía parenteral se elimina por la orina. Otras vías de eliminación son la biliar y la mamaria, aunque en cantidades mucho más pequeñas (Merck y col., 2007). Debe señalarse que estas moléculas se excretan generalmente en forma inalterada, aunque una parte de la dosis administrada (< 20%) puede sufrir transformaciones metabólicas y los derivados del ácido peniciloico que se forman tienden a ser alergénicos (Sumano y Ocampo, 1997).

Las penicilinas no son moléculas estables, siendo sensibles al calor, luz, pH extremo, presencia de metales pesados y compuestos oxidantes-reductores. Suelen deteriorarse en solución acuosa, motivo por el cual deben reconstituirse inmediatamente antes de su aplicación. Debido a que estos compuestos son ácidos orgánicos débiles poco solubles, se los administran en vía parenteral, en disoluciones acuosas u oleosas, así también en forma de sales hidrosolubles (Merck y col., 2007).

Las penicilinas sufren interacción con diversas drogas, siendo las sulfamidas una de ellas, desplazándola del sitio de unión a proteínas plasmáticas y retrasando su acción (Merck y col., 2007).

A las penicilinas se las puede clasificar en base a su espectro de acción antimicrobiana: Penicilinas naturales; Penicilina G y sus sales tienen actividad antimicrobiana sobre microorganismos gram positivos y algunos gram negativos (*Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Pasteurella*). Aminopenicilinas: Ampicilina, Amoxicilina, Tircarcilina, Carbencilina, activas frente a microorganismos

gram positivos y también contra microorganismos gram negativos (*Escherichia Coli*, *Salmonella spp*, *Shigella spp*) pero no contra *estafilococos* productores de penicilinas. Penicilinas resistentes a betalactamasas producidas por cepas de *estafilococos*: Cloxacilina, Dicloxacilina, Oxacilina, Por último, penicilinas potenciadas: Amoxicilina-Clavulánico, de amplio espectro (Merck y col., 2007).

Las primeras cefalosporinas se diferenciaron por sus propiedades farmacocinéticas en comparación con las generaciones más recientes que presentan espectros de actividad más amplios. Las clasificaciones se basan en este principio, según Merck (2007) las más utilizadas en medicina terapéutica se producen en forma semisintética, principalmente a partir de moléculas madres originadas por hongos. Estos compuestos tienen indicaciones análogas a las penicilinas en medicina veterinaria, aunque poseen un mayor espectro de actividad, además, presentan actividad contra microorganismos Gram negativos.

Respecto a su toxicidad, se debe resaltar que las cefalosporinas pueden producir efectos adversos importantes tales como reacciones alérgicas de hipersensibilidad similares a las ocasionadas por las penicilinas y otros efectos como diarreas y reacciones hematológicas (Adams, 2003).

Con respecto a sus propiedades físicas y químicas, son similares a las penicilinas, aunque son más estables frente a los cambios de pH y temperatura. La mayoría de estas moléculas se biotransforma en el hígado y se eliminan por filtrado renal (Merck y col, 2007)

Las cefalosporinas de primera generación son: cefadroxil, cefalexina, cefazolina, cefapirina, cefalotina, y poseen mayor actividad contra gram positivos y gram negativos, como (*Pasteurella spp* y *Salmonella spp*) y bacterias anaerobias. Han demostrado resistencia (*Enterobacter*, *Citrobacter spp*, *Proteus spp* y *Pseudomonas spp*). El grupo de segunda generación: cefamandol, ceforanida, cefoxitina, cefuroxima, posee igual o menor eficacia que las de primera generación contra gram positivos y gram negativos. El uso de estos antibióticos se reserva para infecciones resistentes a las cefalosporinas de primera generación. Las de tercera generación; ceftiofur, cefoperazona, cefotaxima, ceftriaxona, son las más eficaces contra gram negativas resistentes y las menos eficaces contra gram positivos. Son las más eficaces contra (*Pseudomonas aeruginosa*). Cefepima y cefquinoma, son de cuarta generación y

poseen acción contra gram positivos y gram negativos (especies de *Pasteurella*, *Salmonella spp*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Enterobacter*) (Sumano y Ocampo 1997).

Los betalactámicos se utilizan ampliamente en la terapia contra la mastitis por vía parenteral e intramamarias para el tratamiento durante lactación y el secado al igual que sus derivados (Honkanen y col 1995). Además, se emplean para combatir enfermedades uterinas y podales (Rubio y Boggio, 2009; Botsoglou y Fletouris, 2001).

### *II.2.2 Aminoglucósidos:*

En su mayor parte son fármacos bactericidas. Los compuestos de este grupo comparten similares estructuras químicas, con acción antimicrobiana tanto para gérmenes gram negativos y positivos, como para microorganismos aerobios. Su modo de acción es importante frente a microorganismos de rápida multiplicación, siendo su principal sitio de acción los ribosomas bacterianos asociados a la membrana interfiriendo así en su síntesis proteica. Además, de poseer similares propiedades toxicológicas.

Los aminoglucósidos utilizados en la práctica son: estreptomina, kanamicina, tobramicina, gentamicina, amikacina, entre otros.

El sinergismo es frecuente cuando se utilizan en combinación con betalactámicos en los casos de leptospirosis, ya que estos al dañar la pared celular, facilitan el acceso intracelular a los Aminoglucósidos. (Rubio y Boggio, 2009)

Algunas patologías digestivas incrementan su absorción y en caso de alteraciones renales se intensifica su toxicidad, ya que son eliminados por orina sin sufrir metabolización (Merck y col., 2007).

Con respecto a los Aminoglucósidos, se debe señalar que presentan amplio espectro con actividad frente a las bacterias aeróbicas y micoplasmas. Se utilizan en el tratamiento de una gran variedad de infecciones entéricas, respiratorias e infecciones causadas por gérmenes gram negativos en terneros y cerdos (Adams, 2003). Como consecuencia de la alta solubilidad y su reducido transporte a la glándula mamaria, su eliminación en leche proveniente de tratamientos parenterales es muy limitada (Gilbert, 2000). Sin embargo, cuando se administran en forma intramamaria se pueden encontrar en altas concentraciones, motivo por el cual los tiempos de retirada sugeridos por los laboratorios deben respetarse en forma estricta (Ziv y Rasmussen, 1974).

### *II.2.3. Macrólidos:*

Los macrólidos son un conjunto de compuestos estructuralmente emparentados que incluyen eritromicina, tilosina, carbomicina y espiramicina entre otros. Se trata de antibióticos naturales o semisintéticos obtenidos a partir de productos metabólicos de cultivos de cepas de *Streptomyces spp.* (Shryock y col., 1998; Prescott, 2002; Mestorino y Errecalde, 2004; Sádaba y Azanza, 2005).

Desde el punto de vista estructural, poseen un anillo lactónico macrocíclico de 12 a 16 átomos de carbono, carecen de átomos de nitrógeno y presentan escasos o ningún doble enlace. La diferencia en la cantidad de átomos de carbono que posee cada anillo marca las discrepancias que existen entre ellos, en cuanto a su actividad y características farmacocinéticas, químicas y biológicas (Mulazimoglu y col., 2005)

Estas moléculas son activas frente a la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias gram positivos, con limitada o nula actividad para numerosas bacterias gram negativos, que varía según su potencia y actividad (Bryskier y col., 1993; Edder y col., 2002).

Los macrólidos se suelen utilizar como tratamiento alternativo seguro y eficaz de las penicilinas (Epstein y col., 1997), siendo los más utilizados eritromicina, espiramicina y tilosina (Renard, 1994). Por su capacidad de penetrar hasta el lisosoma de los fagocitos, son particularmente activos contra micoplasmas y clamidias, microorganismos que pueden sobrevivir y reproducirse en el interior de estas células (Alós Cortés y col., 2004; Sádaba y Azanza, 2005). Son compuestos básicos, muy liposolubles, de poca solubilidad en agua y al destruirse en medios ácidos hace necesario su uso como sales o como ésteres. Sin embargo la tilmicosina es la más actual y de uso exclusivo en rumiantes. (Rubio y Boggio, 2009).

Poseen capacidad para penetrar barreras celulares y presentan excreción hepática (Sádaba y Azanza, 2005). Se concentran en la secreción biliar y en la leche, de allí la importancia de evaluar su eliminación por este mecanismo (Edder y col., 2002). En la familia de macrólidos se destaca claritromicina, que posee una metilación en el grupo 6-hidroxilo, evitando de este modo la formación del derivado espiroquetal y obteniendo un compuesto mucho más estable en medio ácido (Bryskier y col., 1993; Mulazimoglu y col., 2005).

Dentro de los macrólidos de nueva generación utilizados en la medicina humana modo de ejemplo se encuentran los ketólidos, tales como telitromicina que presenta muy buena respuesta frente a infecciones respiratoria, incluidas aquellas causadas por cepas resistentes a beta-lactámicos y macrólidos, así como patógenos intracelulares (Alós Cortés y col., 2004). Estos compuestos derivan de macrólidos de anillos de 14 carbonos, en los que el agregado de los sustituyentes 3-ceto, metoxi en el C6 y carbamatos en C11 y C12 incrementa la actividad antimicrobiana, confiere una mayor estabilidad en medio ácido y mejora la biodisponibilidad por vía oral, así como también su actividad intracelular (Jalava y col, 2001; Alós Cortés y col., 2004). Estos compuestos presentan baja toxicidad, motivo por el cual se los emplea para el tratamiento de una amplia variedad de infecciones (Aiello, 1998).

Los Macrólidos se emplean preferentemente para combatir infecciones de las vías respiratorias superiores, enteritis bacteriana, metritis, pododermatitis, infecciones urinarias, artritis y otras. En forma específica, eritromicina se utiliza para el tratamiento de la mastitis clínica y subclínica en vacas en lactancia (Wang y Leung, 2007).

También, tilosina presenta muy buena actividad contra (*Mycoplasma* spp.) y espiramicina contra (*Toxoplasma*) (Rubio y Boggio, 2009). Otros macrólidos sintéticos de uso exclusivo en medicina veterinaria, especialmente en infecciones respiratorias de bovinos, son tilmicosina, que se obtiene a partir de la tilosina (Mestorino y Errecalde, 2004) y tulatromicina, derivada de los azálidos (Letavic y col, 2002).

La utilización incorrecta de estos antimicrobianos o el insuficiente tiempo de retirada aumentan la probabilidad de encontrar sus residuos en los productos de origen animal, como leche y carne, incrementándose el riesgo potencial para la salud de los consumidores, ya que pueden producir reacciones alérgicas y sensibilidad (Horie, 1995; Wang y Leung, 2007). Así, por ejemplo, eritromicina y oleandomicina se emplean con mucha frecuencia en formulaciones veterinarias, y sus residuos suelen encontrarse en carne, hígado, riñón, leche y huevos (Edder y col., 2002).

#### *II.2.4. Quinolonas:*

Estos compuestos fueron descubiertos en 1960 y constituyen un importante grupo de sustancias químicas sintéticas con acción bactericida. Actualmente las quinolonas y fluoroquinolonas representan un grupo farmacológico de gran desarrollo y

uso en medicina veterinaria. Actúan inhibiendo la ADN-girasa bacteriana, responsable del enrollamiento del ADN con la consiguiente alteración de su conformación espacial. Según Smith y Lewin (1988), las quinolonas son moléculas anfóteras, muy lipofílicas y poco hidrosolubles; sin embargo, las actuales fluoroquinolonas presentan mejores parámetros farmacocinéticos en comparación con las quinolonas originales, caracterizándose por su absorción rápida en el tracto gastrointestinal, siendo esta vía preferida para su uso en animales pequeños como cerdos y aves (Rubio y Boggio, 2009).

Las concentraciones séricas máximas obtenidas tras la administración oral son similares a los niveles alcanzados mediante administración endovenosa (Borcherding y col., 1996). Estas moléculas presentan muy buena absorción en rumiantes adultos cuando se administran por vía intramuscular y subcutánea. A excepción de la ofloxacina que no se metaboliza, las demás quinolonas se metabolizan en grado diferente. Algunos de sus metabolitos presentan actividad antimicrobiana como ciprofloxacina y norfloxacina que derivan de enrofloxacina y pefloxacina, respectivamente (Dana y col., 2000). Solamente ofloxacina y levofloxacina se eliminan en forma exclusiva por la vía renal (Wolfson y Hooper, 1989; Fitton, 1992). Según Brighty y Gootz (1997) otras quinolonas tales como ácido nalidíxico, cinoxacina, norfloxacina, ciprofloxacina, enoxacina, lomefloxacina y esparfloxacina, son excretadas por las vías gastrointestinal y hepática.

Las quinolonas se utilizaron para el tratamiento de enfermedades bacterianas, incluyendo severas infecciones sistémicas (Brunner y Zeiler, 1988). La mayoría de estas sustancias se absorben rápidamente desde el intestino, con una biodisponibilidad cercana al 90% y penetran en la mayoría de los tejidos y fluidos corporales. Sin embargo, ciprofloxacina y norfloxacina tienen menor biodisponibilidad debido al efecto de reflujo (Sorgel y col., 1989; Lamp y col., 1992).

Numerosos casos de resistencias a quinolonas fueron reportados por Acar y Goldstein (1997) y Stein y Havlichek (1998) tanto por parte de bacterias gram positivos (*Staphylococcus aureus*) como gram negativos (*Pseudomonas aeruginosa*). Estos autores atribuyeron ésta resistencia a las alteraciones en los estados enzimáticos de las quinolonas (ADN girasa), la disminución de la permeabilidad de la membrana externa o el desarrollo de mecanismos de eflujo.

Con respecto a las Quinolonas, su uso está indicado para tratamiento de infecciones locales y sistémicas causadas por microorganismos sensibles, especialmente por patógenos intracelulares. Se prescriben para el tratamiento de infecciones pulmonares, urinarias y digestivas (Lara y col., 2006). Las fluoroquinolonas más empleadas son enrofloxacin, ciprofloxacina, marbofloxacina y danofloxacina (Rubio y Boggio, 2009), por presentar una excelente seguridad y tolerabilidad, su uso constituye una alternativa de las penicilinas y las cefalosporinas (Borcherding y col., 1996). Debido a que las fluoroquinolonas tienen un gran volumen de distribución, se concentran en los tejidos a niveles que pueden superar sus niveles séricos. La penetración es particularmente alta en tejido renal, pulmón, próstata, bronquios, nasales, vesícula biliar, vía biliar y genitales (Stein, 1996; Garey y Amsden, 1999).

#### *II.2.5. Tetraciclinas:*

La primera tetraciclina fue descubierta en el año 1945 con el nombre de aureomicina, principio activo al que actualmente se denomina clortetraciclina. El segundo componente del grupo fue aislado a partir de una cepa mutante de *Streptomyces spp* y se llamó demeclociclina. Estos compuestos, junto con la oxitetraciclina y la tetraciclina, constituyen las tetraciclinas de primera generación o naturales, las restantes son derivados semisintéticos y constituyen las tetraciclinas de segunda generación, entre las que se incluyen la metaciclina, doxiciclina y minociclina. Sus derivados son sustancias cristalinas, amarillentas y anfóteras que forman sales con ácidos y bases en solución acuosa. Se caracterizan por presentar fluorescencia cuando se exponen a la luz ultravioleta y por su inestabilidad a la luz directa y pH elevados.

Las principales diferencias entre las tetraciclinas radican en sus comportamientos farmacocinéticos. Por ello, se las clasifica en compuestos de acción corta: tetraciclina, oxitetraciclina, clortetraciclina, acción intermedia: dimetil-clortetraciclina y metaciclina y acción prolongada: doxiciclina y minociclina. (Rubio y Boggio, 2009)

Estas moléculas poseen actividad antimicrobiana, interfiriendo en la síntesis proteica y por lo tanto en el crecimiento y multiplicación de los microorganismos (Merck y col., 2007). Presentan buena actividad contra los microorganismos (*Bacillus spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Listeria monocytogenes*,

*Streptococcus* spp., *Actinobacillus* spp., *Bordetella* spp., *Brucella* spp., *Francisella tularensis*, *Haemophilus* spp., *Pasteurella multocida*, *Yersinia* spp., *Actinomyces* spp., *Fusobacterium* spp., *Chlamydia* spp., *Rickettsia* spp), además de algunos protozoos y (*Anaplasma* spp). (Prescott y Baggot, 2002). Poseen actividad antimicrobiana frente a algunas especies de (*Estafilococos*, *Enterococos*) algunos miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (*Enterobacter* spp., *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Salmonella* spp.) y algunos anaeróbicos como (*Bacteroides* spp., y *Clostridium* spp). Por el contrario, algunas infecciones resultan resistentes a las tetraciclinas, especialmente aquellas que proceden de (*Mycobacterium* spp., *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia* spp., y algunos *Micoplasma* spp). (Adams, 2003).

El grupo de las tetraciclinas se utiliza mundialmente en producción animal debido a su amplio espectro que inhibe el crecimiento de una extensa variedad de bacilos y cocos gram positivos y bacilos gram negativos (Cinquina y col, 2003; Zhao y col., 2004). Actualmente, se utilizan para el tratamiento de mastitis en ganado vacuno lechero, principalmente por vía parenteral para tratar la mastitis colibacilar y endometritis infecciosa (Sumano y Ocampo, 1997). la administración oral está contraindicada por dañar severamente a la flora de los preestómagos e intestino (Schumaner, 1968); aunque su uso está limitando a favor de los ATBs llamados de “nueva generación” como las cefalosporinas de 3ª y 4ª generación, fluoroquinolonas (Busani y col., 2003, 2004).

En general, entre el 50 y el 80% de las tetraciclinas se excretan principalmente por vía renal y por eliminación biliar (10-20%). También se eliminan en la leche, con concentraciones máximas a las 6 horas de su administración parenteral y detectándose pequeñas cantidades hasta 48 horas después del tratamiento (Merck y col., 2007). Se emplean en el tratamiento de infecciones sistémicas como enteritis bacterianas, metritis, mamitis entre otras, y locales, como la queratoconjuntivitis infecciosa en ganado bovino, la clamidiasis y la actinobacilosis entre otras enfermedades específicas (Zorraquino, 2005).

Panjarathinam y col., (1974) demostraron que la dosis única de 150 mg de oxitetraciclina o de clortetraciclina vaca/día reduce el contenido bacteriano total del líquido ruminal desde  $0,9 \times 10^9$  bacterias/ml hasta  $0,36 \cdot 10^9$  bacterias/ml. Además, Gyrd-Hansen y col., (1981) señalan que la administración de tetraciclina por vía endovenosa a



los bovinos, produce colapso agudo, probablemente como consecuencia de su unión con los iones calcio y el consiguiente efecto depresor sobre el sistema cardiovascular.

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

#### *II.2.6. Sulfamidas:*

Las sulfonamidas fueron los primeros agentes quimioterapéuticos eficaces que se emplearon sistemáticamente en la prevención y cura de las infecciones bacterianas (Sumano y col., 1997; Pérez-Trallero y col., 2003). Son compuestos antimicrobianos sintéticos de amplio espectro con actividad frente a una gran variedad de microorganismos gram positivos y gram negativos cuyo uso frecuente ha desarrollado actualmente amplias resistencias en numerosos microorganismos.

Las sulfonamidas y sus derivados se clasifican en varios grupos, basados principalmente en sus indicaciones y en la duración de su acción en el organismo, tales como compuestos de uso habitual sulfatiazol, sulfametazina, sulfapiridina, sulfadimetoxina, etc, compuestos muy solubles, empleados en infecciones urinarias sulfisoxazol, sulfasomidina, etc., compuestos poco solubles, empleados en infecciones entéricas talilsulfatiazol, succinilsulfatiazol, salicilazosulfapiridina, etc., compuestos potenciados trimetoprim-sulfadiacina, trimetoprim-sulfametoxazol, trimetoprim-sulfadoxina, etc. y compuestos de uso tópico: sulfacetamida para aplicación oftalmológica, mafenida y sulfadiacina para quemaduras, sulfatiazol para heridas, etc.

Respecto a las sulfonamidas, pese a su antigüedad, se continúan empleando con fines terapéuticos y profilácticos, tanto en medicina humana (Kim y Park, 1998) como en medicina veterinaria (Schwarz y Chaslus Damcla, 2001). Estos quimioterapéuticos inhiben las bacterias gram negativas y gram positivas, algunas (*Clamidias, Nocardia, Actinomyces spp*) y algunos protozoos. Las más activas pueden actuar frente varias especies de (*Streptococcus spp, Staphylococcus spp, Salmonella spp, Pasteurella spp* e

incluso *Escherichia coli*). La mayoría de las sulfonamidas se excretan principalmente en la orina, mientras que la bilis, las heces y la leche constituyen vías menores de eliminación (Merck y col., 2007).

#### II.2.7. Lincosamidas:

La lincomicina fue aislada en el año 1962 a partir de *Streptomyces lincolnensis*. Dentro de este grupo de antibióticos se destacan la lincomicina y la clindamicina por utilizarse ampliamente en la práctica clínica. La lincomicina se produce naturalmente a partir de varias especies de *Streptomyces lincolnensis*, *Streptomyces spinosus* y *Actinomyces roseolus*, mientras que clindamicina es un derivado semisintético (Magerlein y col., 1966).

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

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

Por último, las lincosamidas se indican para el tratamiento de osteomielitis o artritis por *Staphylococcus aureus*. También para el control de mastitis clínica y subclínica del ganado vacuno, ovino y caprino se emplean lincomicina y pirlimicina por vía intramamaria (Barnas y Nimphius, 1996; Bruguera y García, 1998).

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

## **II.3 Eliminación de antibióticos en leche**

No existen dudas que el uso de antibióticos en la producción animal mejora el estado sanitario, aunque genera residuos que pueden eliminarse por leche y persistir durante un cierto tiempo, tanto en los animales como en los productos elaborados (Debackere, 1995; Pascal-Sander, 2005) Entre los principales riesgos que pueden ocasionar estos residuos se destacan los problemas de toxicidad a consumidores sensibles (Debackere, 1995; Macri y Mantovani, 1995; Moretain, 1996; Heeschen, 1993), dificultades en la fabricación de productos lácteos fermentados, como queso y yogurt (Berruga y col., 2007; Nawaz, y col., 2011), además de producir un impacto ambiental en caso de verterse en campos o cursos de aguas (Martinez-Carballo ,2007; Kemper, 2008). De esta forma, sus efectos negativos se pueden clasificar en:

### *II.3.1. Efectos sobre el consumidor:*

Actualmente, este hecho constituye la principal preocupación por parte de los consumidores. La sensibilización producida por una ingestión repetida de pequeñas dosis (Lyn, 1992), procesos alérgicos que en casos extremos pueden producir anafilaxia (Demoly y Romano, 2005, Wang y Leung, 2007, Khaskheli y col; 2008), actividad carcinogénica de ciertas moléculas como las sulfamidas (Littlefield, 1990) y desarrollo de resistencias a ciertos antimicrobianos (Stein y Havlichek, 1998; Tollefson y Karp, 2004, Abriouel y col; 2008), entre otros.

Además, se debe destacar que, algunas de estas sustancias farmacológicas resisten las altas temperaturas de los tratamientos industriales empleados en la pasteurización de la leche y pueden llegar al consumidor (Oda y Hiwaki, 1996, Zorraquino y col., 2008a, 2009), hecho que agrava el problema para la salud pública. Por ello, los antibióticos pueden alcanzar al consumidor y producir los mencionados efectos adversos en la salud humana (Dewdney y col., 1991; Currie y col., 1998). Además, estas consecuencias se agudizan en aquellos sectores de la población más débiles, como los ancianos y los niños, ambos tradicionalmente consumidores de productos lácteos.

### *II.3.2. Industria:*

La presencia de antibióticos en leche ocasiona inconvenientes a las empresas lácteas, puesto que sus residuos dificultan y/o ralentizan los procesos fermentativos implicados en la elaboración de queso y yogurt, pudiendo retrasar la acidificación, dificultar el cuajado y la maduración (Mourot y Loussouarn, 1981; Brady y Katz, 1987, Goursand, 1991; Suhren, 1995, Del Prato, 1997, Jones, 1999), dando lugar a productos de inadecuada calidad (Packham y col., 2001). En efecto, el uso de leche conteniendo estos fármacos, actúa como sustancia inhibitoria para la preparación de lactofermento, retardando la multiplicación de las bacterias lácticas o bloqueando su acción cuando se altera el equilibrio microbiológico.

El desarrollo de otros microorganismos productores de gases modifica la acidificación de la masa, generando un exceso de humedad en la misma. Esta fermentación anormal produce cambios en el gusto del queso al conceder un sabor amargo debido a la liberación de peptonas de procesos proteolíticos propios de microorganismos coliformes, y el sabor debido a lipólisis (Mäyrä-Mäkinen, 1995) que otorga un gusto picante.

Los microorganismos Gram negativos y Coliformes presentan, a diferencia de los lactobacilos, una gran capacidad para desarrollarse en presencia de ATBs. Así, por ejemplo, la penicilina en concentraciones de 0,2-0,7 ppm puede bloquear el proceso de acidificación y a 0,01 ppm puede alterar la formación normal del aroma del queso (Bonato y Spalaor, 1994). Otro ejemplo, es la presencia de tetraciclinas en la leche que puede dar lugar a pérdidas económicas, puesto que inhiben el starter de los medios de cultivos y producen modificaciones de las características organolépticas de los productos fermentados como queso y yogurt (Perreten y teuber, 1995; Packham y col., 2001).

### *II.3.3. Ambiente:*

Una cantidad importante de estos ATBs administrados a los animales no se metaboliza y se elimina por la orina, heces y leche (Forth y col., 1992). Los antibióticos contenidos en el estiércol procedentes de animales tratados pueden fijarse a las partículas del suelo (Samuelsen y col., 1992; Halling- Sorensen y col., 2003, Kemper, 2008) y producir cambios en la composición de la flora microbiana de estos (Ingham y

Coleman, 1984; Mc Cracken y Foster, 1993, Colinas, 1994; Thiele y Beck, 2001, Chander, 2005).

Por otro lado, algunos antimicrobianos tales como las quinolonas, pueden llegar a contaminar las aguas superficiales y subterráneas (Alder y col., 2001) cercanas a las lagunas de almacenamiento de efluentes provenientes de establecimientos ganaderos, pudiendo persistir en los sistemas acuáticos (Al-Ahmad y col., 1999; Kümmerer, 2000). Por último, numerosos antibióticos pueden fijarse a los vegetales (Jemba, 2002; Kumar y col., 2005, Feng y col., 2009) e incorporarse a la cadena alimentaria, llegando al consumidor (Kennedy y col., 2000).

En Argentina, Nosseti y col., (2002) realizaron estudios sobre porcentajes de efluentes generados en las instalaciones de ordeño corresponde a tambos que eliminan sus desechos en lagunas artificiales (58.53%). A su vez, el 80% de estos efluentes se eliminan en las lagunas en algún curso de agua. El mismo estudio, señala que un 20% de tambos vierten sus efluentes sin previo tratamiento a algún curso de agua (arroyos o lagunas), mientras que el resto de los tambos elimina sus desechos en algún potrero del establecimiento como destino final. El riego de suelos con efluentes provenientes del tambo (incluidos los de limpieza de la ordeñadora y del tanque de frío) no representa una alternativa adecuada para restituir los nutrientes del suelo. Así lo demuestran estudios realizados en INTA por Charlón (2004) al señalar que la aplicación de efluentes de tambo mediante un equipo de riego por aspersión sobre una pastura de alfalfa produjo manchones sin plantas en el sector regado, provocado por encharcamientos. Si bien, se verificó un incremento de materia orgánica, nitrógeno y fósforo en el suelo tratado, no se vio acompañado de un incremento en la producción de pasto con respecto al grupo testigo.

#### *II.3.4. Pérdidas económicas al productor:*

En Argentina, la economía láctea de la provincia Santa Fe es la tercera en orden de importancia. Destacándose sus actividades agropecuarias e industriales, en los departamentos del centro-sur de dicha provincia, donde se encuentra la ciudad de Esperanza. Se trata de un sector importante en la cuenca lechera del país, con registros de aproximadamente 3.000 millones de litros de leche en el año 2010, representando la

tercera parte de la producción de la Argentina. Toda esta actividad se facilita por las buenas pasturas que posibilitan la cría de un ganado vacuno de excelente calidad.

Desde el punto de vista económico, la incidencia negativa originada por los antimicrobianos es muy significativa, ya que solo 10 litros de leche provenientes de una vaca tratada con penicilina pueden contaminar el contenido de un camión cisterna 10.000 litros de leche y los grandes silos de almacenamiento de una industria láctea de aproximadamente 200.000 litros (Brouillet, 1994).

Respecto a estas pérdidas económicas, la presencia de residuos afecta también al propio tambero o productor, quién responsablemente debe afrontar una penalización en el precio por parte de la industria láctea. En efecto, un tambero que entrega leche y contamina un camión cisterna, es penalizado por la totalidad del contenido del camión, llegando inclusive a afrontar los costos económicos de la producción de leche entregada por los otros tambos que completan el volumen de la cisterna contaminada. Además, las autoridades sanitarias prohíben la comercialización de la leche con residuos de ATBs, y la califican como “no apta para consumo humano” (ley N° 18.284) debiendo ser decomisada cuando se verifique la presencia de residuos antimicrobianos en cantidades superiores a los máximos indicados por la legislación. Esta leche se considera no apta para su la comercialización (Reglamento UE N° 37/2010, Código Alimentario Argentino Art. 556, Res 2270, 14.9.83).

#### **II.4. Aspectos legales**

Para controlar la presencia de residuos de medicamentos en los alimentos, existen diferentes legislaciones, como Codex Alimentarius, Unión Europea y Código Alimentario Argentino han establecido los Límites Máximos de Residuos (LMRs). Así, en la Unión Europea, el Grupo de trabajo de Seguridad de Residuos del Comité de Medicamentos Veterinarios (CVMP, del inglés Committee for Veterinary Medicinal Products) fijó los LMRs para diferentes productos alimenticios.

El Límite Máximo de Residuo (LMR) de Medicamentos Veterinarios es: *“el contenido máximo (concentración) de residuos resultante de la utilización de un medicamento veterinario autorizada en la CEE o reconocida como admisible en un producto alimenticio”*. Los residuos de medicamentos veterinarios son *“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”*. Reglamento 2377/90/CEE (CEE, 1990) en los anexos I, II o III y IV.

Debido a que estas sustancias no se destruyen con los tratamientos térmicos de la industria láctea como son la pasteurización y la esterilización (Zorraquino, 2005), pueden encontrarse en la leche. Con motivo de evitar los problemas de sus residuos, la comisión reguladora de la CEE (reglamento UE, 2010) ha definido los límites para la presencia de residuos de antibióticos de uso veterinario en leche. A continuación, en Tabla 4 se exponen los Límites Máximos de Residuo para sustancias antimicrobianas. Definidas en Unión Europea, Codex Alimentarius y FDA (food and drug administration)

#### *II.5.1 Legislación en Argentina*

En Argentina, por medio del DECRETO 815/1999 del Poder Ejecutivo Nacional, se establece el Sistema Nacional de Control de Alimentos (SNCA) con el objetivo de asegurar el cumplimiento del Código Alimentario Argentino (CAA), que es la norma fundamental del SNCA y que integra a la Comisión Nacional de Alimentos (CONAL), al Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA Resol. 559/11) y a la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT).

La calidad de alimentos está regulada por el Código Alimentario Argentino (CAA), ampliado con normas del MERCOSUR y del CODEX, a través de sus artículos 555, 556, 556 bis del Capítulo VIII. En el artículo 556 del CAA, se describen los valores de Límites Máximos de Residuos (LMRs) de antibióticos que pueden estar presentes en la leche. Dichos valores fueron aprobados por la Comisión del Codex Alimentario en su décimo séptimo período de sesión, según se exponen en Tabla 4.

SENASA, por medio de la Resolución N° 256/2003, adoptó los LMRs establecidos por el CODEX (CODEX ALIMENTARIUS, 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.

**Tabla 4.** Límites máximos de residuos (LMRs) establecidos por el Codex Alimentarius, Unión Europea y tolerancia en USA de antimicrobianos en leche

Sustancia	LMR Codex <sup>1</sup>	LMRs EU <sup>2</sup>	SL/Tolerance USA <sup>3</sup>
<b><i>β-lactámicos</i></b>			
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
Cefquinoma		20	-
Acido Clavulánico		200	-
<b><i>Tetraciclinas</i></b>			
Clortetraciclina		100	300
Oxitetraciclina	100	100	300
Tretetraciclina		100	300
<b><i>Sulfonamidas (todas)</i></b>			
Sulfadimetoxina		100	10
Sulfameracina		100	10
Sulfatiazol		100	10
Sulfadiazina		100	10
<b><i>Macrólidos</i></b>			
Eritromicina		40	50
Espiramicina	200	200	-
Tilmicosina		50	-
Tilosina		50	50
<b><i>Aminoglucósidos</i></b>			
Gentamicina		100	30
Neomicina	500	1500	150
Espectinomomicina		200	-
DH/Estreptomomicina	200	200	125
<b><i>Quinolonas</i></b>			
Enrofloxacina		100	-
Marbofloxacina		75	-
<b><i>Varios</i></b>			
Cloranfenicol		0	0
Novobiocina		50	100
Trimetoprim		50	-

Unidades: µg/Kg. <sup>1</sup>Codex Alimentarius(<http://apps1.fao.org/servlet/org.fao.waicent.codex.VetDrugServlet>)

<sup>2</sup>Reglamento 2377/90 y sucesivos reglamentos modificadores. Enero 2009; <sup>3</sup>Code of Federal Regulation (CFR) 21 Part 556 (M-I-05-5)



El plan CREHA (Plan Nacional de Control de Residuos e Higiene en Alimentos) en Argentina, persigue como objetivo preservar los productos de la alimentación humana según lo establecido en el SENASA. Cap. IX del Dec. 4238/68 - Resolución 290/95 modificada. 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. Mediante este plan, el SENASA exige a las empresas comercializadoras de productos para el consumo humano el análisis para la detección de antibióticos, sulfonamidas, ivermectina, albendazol, plomo, cadmio, arsénico, mercurio, aflatoxinas, clorados y fosforados. Las tomas de muestras de leche se deben realizar cada dos meses, o bien una o dos veces al año, según la cantidad de litros de leche 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). Dentro de las metodologías analíticas de screening para la detección de antimicrobianos en leche, se autoriza el uso de métodos de tipo microbiológicos, inmunoenzimáticos, colorimétricos o de receptores (CAA, 2001).

Con respecto a la protección del medio ambiente, las legislaciones de las diferentes provincias contemplan las acciones que se deben realizar para preservar un ambiente ecológico y adecuado para la vida de sus habitantes. Así, por ejemplo, la Provincia de Santa Fe mediante la ley N° 11.717/99 de Medio ambiente y desarrollo sustentable, reglamentada por Decreto 63/99, establece los principios rectores para preservar, conservar, mejorar y recuperar el medio ambiente, los recursos naturales y la calidad de vida de la población, de modo tal de asegurar el derecho irrenunciable de toda persona a gozar de un ambiente saludable, ecológicamente equilibrado y adecuado para el desarrollo de la vida y la dignidad del ser humano.

Para el caso concreto de las industrias, la provincia de Santa Fe establece el Decreto 1844 de la ley N° 11.525/98 regula y controla la generación, manipulación, almacenamiento, tratamiento y disposición final de los residuos peligrosos (Anexo I

categoría Y3), desechos de medicamentos y productos farmacéuticos para la salud humana y animal.

En la Resolución 1089/82 de la Provincia de Santa Fe se establece el control del vertido de líquidos residuales y se establecen las condiciones que deberá ajustarse el efluente y el proyecto en sus etapas de construcción, reparación, modificación, mantenimiento y contralor de funcionamiento de las instalaciones de que debe dotarse a aquellos inmuebles cuyos líquidos residuales requieran un tratamiento previo para alcanzar las condiciones de vuelco aceptables para su descarga a los cuerpos receptores.

#### *II.4.2. Métodos de screening utilizados para la detección de antibióticos en la leche*

Los primeros métodos microbiológicos utilizados para la detección de residuos de antibióticos en la leche se implementaron a mediados del siglo XX y detectaban fundamentalmente la acción inhibidora como un efecto de la presencia de antimicrobianos (naturales o artificiales) en la leche. Por ello, se los denominaban “test de inhibidores” (Bishop y White, 1984). Desde entonces, diferentes casas comerciales han mejorado las propiedades de estos métodos, tales como: rapidez de la respuesta, exactitud, sencillez, fecha de caducidad, especificidad y límites de detección para una mayor cantidad de moléculas de antibióticos. Sin embargo, hasta el presente, no se dispone de un método ideal, es decir, un único método que sea capaz de detectar la totalidad de los antibióticos utilizados en la terapéutica del ganado a niveles equivalentes a los LMRs de cada molécula. Por ello, algunos autores proponen el empleo del uso simultáneo dos o más métodos microbiológicos que utilicen dos bacterias-test complementarias a fin lograr una mayor cobertura de moléculas de antimicrobianos a detectar (Nagel y col., 2011).

Actualmente, la Decisión 2002/657/CE clasifica a los métodos analíticos utilizados para la detección de xenobióticos en dos grupos: los métodos cualitativos (microbiológicos, enzimáticos, receptores proteicos, etc.) y cuantitativos (cromatografía MS-MS-HPLC, DAD-HPLC, UV-HPLC, etc.). A su vez, esta decisión, clasifica a los métodos de detección en dos categorías: métodos de screening o cribado y métodos de confirmación.

Los primeros cumplen la función de detectar la simple “presencia” o “ausencia” de moléculas o grupos de moléculas a niveles próximos a los LMRs, mientras que los

métodos de confirmación posterior, permiten identificar y cuantificar de manera inequívoca a cada molécula a niveles incluso inferiores a los LMRs.

Para el caso concreto de la leche, los métodos de cribado utilizados en forma más frecuente son los métodos microbiológicos, tales como Delvotest<sup>®</sup>, BRT<sup>®</sup> AiM, Charm<sup>®</sup> Blue-Yellow, Eclipse<sup>®</sup> 100 ov; mientras que los enzimáticos, como Penzym<sup>®</sup>, hacen uso de D-D-Carboxipeptidasa. Finalmente, los métodos de receptores proteicos tales como SNAP<sup>®</sup> Combo, Twinsensor<sup>®</sup>, ROSA Charm<sup>®</sup>, emplean receptores de alta especificidad aislados y purificados de membranas celulares bacterianas.

Los métodos de inhibición microbiológica se basan en la inhibición del crecimiento de un microorganismo específico (microorganismo de prueba o bacteria-test) utilizada como sensor biológico para la detección de estos inhibidores en un medio de cultivo agarizado adecuado que contiene además una fuente rica en hidratos de carbono, sustancias mejoradoras de la sensibilidad (como trimetoprim, cloranfenicol, etc.) e indicadores de pH (o redox) de manera que el resultado se puede interpretar visualmente mediante el cambio en la coloración (Pikemaat y col., 2009). De este modo el método se coloca a incubar en estufa con la muestra de leche a analizar. En caso que la muestra esté libre de antibiótico, se producirá el desarrollo del microorganismo acompañado de un cambio en la coloración del indicador ácido-base (o redox), mientras que la presencia de antibióticos en la leche no permitirá el desarrollo del microorganismo de prueba y por lo tanto se conservará el color inicial del indicador ácido-base (o redox).

Entre las propiedades más importantes de estos métodos, se destaca el límite de detección, o la capacidad de detección ( $CC\beta$ ) para cada molécula y se define, según la Directiva 2002/657/CE, como “*el contenido mínimo de la sustancia que puede ser detectado, identificado o cuantificado en una muestra, con una probabilidad de error  $\beta$ . En el caso de sustancias para las que no se ha establecido un límite permitido, la capacidad de detección es la concentración mínima en la que un método puede detectar muestras realmente contaminadas con una certeza estadística de  $1 - \beta$ . En el caso de sustancias para las que se ha establecido un límite permitido, la capacidad de detección es la concentración en la que un método puede detectar límites de concentración permitidos con una certeza estadística de  $1 - \beta$* ”. En la Tabla 5 se resumen los límites de detección de algunos de los métodos de inhibición

microbiológica disponibles en el mercado. Según se aprecia en dicha Tabla, los diferentes métodos microbiológicos presentan límites de detección de los antibióticos betalactámicos cercanos a sus respectivos LMRs, debido a que la bacteria-test *Geobacillus stearothermophilus* posee muy buena sensibilidad para este grupo de antimicrobianos.

Sin embargo, los límites de detección para las tetraciclinas son superiores a los LMRs. Para las sulfamidas, la mayoría de los test han ajustado los límites de detección al LMR (100 µg/l) mediante la incorporación de trimetoprim. Para eritromicina, tilosina, tilmicosina y neomicina los niveles de detección son próximos a sus LMRs, mientras que los residuos de quinolonas, espiramicina, kanamicina, estreptomicina y tetraciclinas no llegan a ser detectados por estos métodos puesto que *Geobacillus stearothermophilus* no es sensible a estas moléculas.

**Tabla 5.** Límites de detección ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) de diferentes antibióticos utilizando métodos de inhibición microbiológica

<b>Antibiótico</b>	<b>LMR</b>	<b>Delvotest SP</b>	<b>BRTAiM</b>	<b>Eclipse</b>	<b>Charm BY</b>
<b><i>Penicilinas</i></b>					
Benzilpenicilina	4	1-2	1,5-2	4	3-4
Ampicilina	4	4	2-3	5	5
Amoxicilina	4	2-3	2-3	5	5-6
Oxacilina	30	10	5-10	25	-
Cloxacilina	30	20	10-20	40	30-50
Dicloxacilina	30	10	5-10	-	-
Nafcilina	30	-	5-10	-	-
Cefapirina	60	4-6	4-5	8	10
Ceftiofur	100	25-50	50-100	-	50-100
Cefoperazona	50	-	20-30	-	-
Cefalexina	100	-	100-200	75	-
Cefquinoma	20	-	80-100	-	-
<b><i>Tetraciclinas</i></b>					
Tetraciclina	100	250-500	100-200	150	-
Oxitetraciclina	100	250-500	250-500	150	300
Clortetraciclina	100	-	-	-	-
<b><i>Sulfamidas</i></b>					
Sulfametazina	100	25-100	100-300	200	-
Sulfadimetoxina	100	-	100	-	50
Sulfatiazol	100	-	100	75	-
Sulfadiazina	100	25-50	100	-	-
<b><i>Macrólidos</i></b>					
Eritromicina	40	40-80	40-60	300	-
Espiramicina	200	400-600	200-400	1000	-
Tilmicosina	50	-	-	-	-
Tilosina	50	30	25-50	80	75-100
<b><i>Aminoglucósidos</i></b>					
Gentamicina	100	50	100-200	500	300-400
Neomicina	1500	100-200	500-750	1500	-
Kanamicina	150	-	-	6000	-
DH/Estreptomicina	200	-	400-600	2500	-
<b><i>Quinolonas</i></b>					
Enrofloxacina	100	-	-	-	-
Flumequina	50	-	-	-	-

Fuente: Nagel, *y col.* 2011b

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo consta de dos estudios, en el primero de ellos se determinaron los límites de detección de un bioensayo en placas de Petri que utiliza *Geobacillus thermoleovorans* como bacteria-test para la detección de agentes antimicrobianos en la leche. El segundo contempla el diseño y la validación de un ensayo biológico en placas de microtitulación que brinde una respuesta colorimétrica en un tiempo reducido con adecuada sensibilidad a los antimicrobianos comúnmente utilizados en el tratamiento de enfermedades del ganado vacuno productor de leche.

#### III.1. ESTUDIO I: Límites de detección del bioensayo en placa de Petri que utiliza *G. thermoleovorans*

##### III.1.1. Disoluciones de fármacos y muestras fortificadas

Se utilizaron 26 agentes antimicrobianos (9 betalactámicos, 3 aminoglucósidos, 4 macrólidos, 3 quinolonas, 3 tetraciclinas y 4 sulfonamidas) empleados en los tratamientos veterinarios del ganado vacuno.

Las diferentes sustancias antimicrobianas utilizadas en esta etapa experimental, así como su procedencia comercial y el disolvente más adecuado para la preparación de las disoluciones se muestran en la Tabla 6, mientras que las concentraciones empleadas para cada fármaco se exponen en la Tabla 7.

Para la determinación de los límites de detección de las diferentes sustancias 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 alteración por el efecto del tiempo y/o por la acción de la luz.

Para la preparación de las disoluciones se pesó en una balanza analítica  $0,0100 \text{ g} \pm 0,0001 \text{ g}$  de cada sustancia (teniendo en cuenta la pureza que informaba el fabricante) y se disolvió en un matraz de 10 mL, utilizando el disolvente más adecuado para cada sustancia (Tabla 6). 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 intermedias A, B y C, que correspondían a las concentraciones de 100, 10 y 1 mg/L.

**Tabla 6.** Antimicrobianos y disolventes empleados en el Estudio I

Sustancias antimicrobianas	Disolvente	Ref. comercial	
<i>Betalactámicos</i>	Penicilina G	H <sub>2</sub> O	Sigma PEN-Na
	Amoxicilina	H <sub>2</sub> O	Sigma A-8523
	Ampicilina	H <sub>2</sub> O	Sigma A-1593
	Cloxacilina	H <sub>2</sub> O	Sigma C-9393
	Oxacilina	H <sub>2</sub> O	Sigma O-1002
	Cefadroxilo	H <sub>2</sub> O	Sigma C-7020
	Cefalexina	H <sub>2</sub> O	Sigma C-4895
	Cefoperazone	H <sub>2</sub> O	Sigma C-4292
	Ceftiofur	NaOH 0,1 N	Vatranal 34001
<i>Aminoglucósidos</i>	Kanamicina	H <sub>2</sub> O	Sigma K-4000
	Neomicina	Buffer fosfato pH 8	Sigma N-1876
	Estreptomicina	H <sub>2</sub> O	Sigma S-6501
<i>Macrólidos</i>	Eritromicina	Metanol	Sigma E-6376
	Tilosina	Metanol	Sigma T-6134
	Tilmicosina	H <sub>2</sub> O	Sigma 33864
	Lincomisina	H <sub>2</sub> O	Sigma L-6004
<i>Quinolonas</i>	Ciprofloxacina	NaOH 0,1 N	Sigma 17850
	Enrofloxacina	NaOH 0,1 N	Vetranal 33699
	Marbofloxacina	NaOH 0,1 N	Sigma N-9890
<i>Tetraciclinas</i>	Clortetraciclina	NaOH 0,1 N	Sigma C-4881
	Oxitetraciclina	HCl 0,1N	Sigma O-5750
	Tetraciclina	HCl 0,1N	Sigma T-3258
<i>Sulfonamidas</i>	Sulfadimetoxina	H <sub>2</sub> O	Sigma S-7385
	Sulfametazina	Metanol	Sigma S-5637
	Sulfametoxazol	NaOH 0,1 N	Sigma S-9251
	Sulfatiazol	H <sub>2</sub> O	Sigma S-0127

Las muestras de leche fortificadas con ATBs se prepararon en matraces aforados de 10 mL. Para cada caso se tomó, con ayuda de una micropipeta, la cantidad necesaria de las disoluciones intermedias de antibiótico preparadas anteriormente (A, B, C, “stock”), siguiendo las recomendaciones de la FIL (1997), de modo tal que el volumen de cada disolución intermedia empleado no supere el 1% del volumen final de la disolución de leche. De cada uno de los fármacos estudiados se prepararon 5 concentraciones y una muestra de leche sin la adición del fármaco, que se utilizó como control negativo (Tabla 7).

**Tabla 7** Concentraciones de sustancias antimicrobianas

Sustancias antimicrobianas	Concentraciones ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ó $^*\text{mg}/\text{kg}$ )	
<i>Betalactámicos</i>	Penicilina G	8, 16, 32, 64, 128
	Amoxicilina	8, 16, 32, 64, 128
	Ampicilina	16, 32, 64, 128, 256
	Cloxacilina	200, 400, 800, 1600, 3200
	Oxacilina	100, 200, 400, 800, 1600
	Cefadroxilo	100, 200, 400, 800, 1600
	Cefalexina	200, 400, 800, 1600, 3200
	Cefoperazone	100, 200, 400, 800, 1600
	Ceftiofur	100, 200, 400, 800, 1600
<i>Aminoglucósidos</i>	Kanamicina	2000, 4000, 8000, 16000, 32000
	Neomicina	750, 1500, 3000, 6000, 12000
	Estreptomina	1000, 2000, 4000, 8000, 16000
<i>Macrólidos</i>	Eritromicina	100, 200, 400, 800, 1600
	Lincomicina	150, 300, 600, 1200, 2400
	Tilmicosina	50, 100, 200, 400, 800
	Tilosin	50, 100, 200, 400, 800
<i>Quinolonas</i>	Ciprofloxacina	2000, 4000, 8000, 16000, 32000
	Enrofloxacina	2000, 4000, 8000, 16000, 32000
	Marbofloxacina	2000, 4000, 8000, 16000, 32000
<i>Tetraciclinas</i>	Clortetraciclina	800, 1600, 3200, 6400, 12800
	Oxitetraciclina	100, 200, 400, 800, 1600
	Tetraciclina	400, 800, 1600, 3200, 6400
<i>Sulfonamidas</i>	Sulfadimetoxina	200 400 600 800 1200 <sup>*</sup>
	Sulfametazina	200 400 600 800 1200 <sup>*</sup>
	Sulfametoxazol	200 400 600 800 1200 <sup>*</sup>
	Sulfatiazol	200 400 600 800 1200 <sup>*</sup>

### III.1.2. Diseño experimental

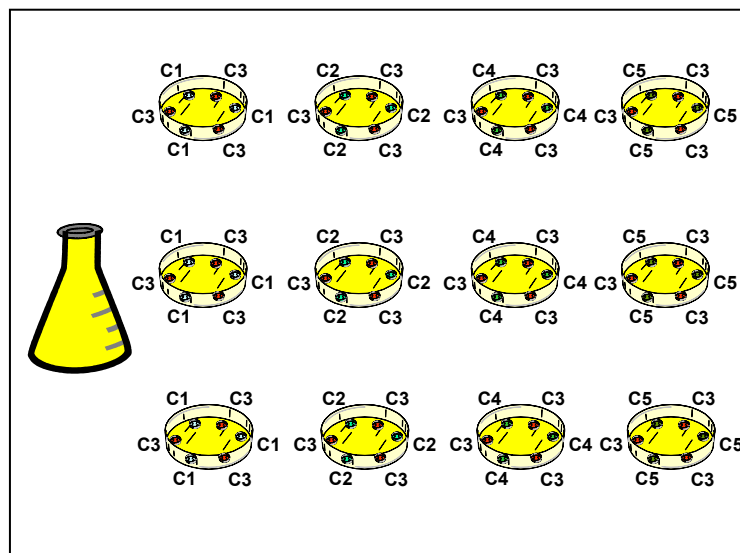
Para cada fármaco se procedió a diseñar un experimento siguiendo las directrices establecidas por la AOAC para métodos microbiológicos de detección de antibióticos (AOAC, 1995). Para ello, se prepararon 5 concentraciones de cada antibiótico ( $C_1$ ,  $C_2$ ,  $C_3$ ,  $C_4$  y  $C_5$ ) en orden creciente a partir de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM



determinada en fase pre experimental, siendo cada una de ellas el doble de la anterior. En la Figura 2 se esquematiza la elaboración de las 12 placas de Petri por cada antibiótico ensayado.

En cada una de las placas, se colocó por triplicado la concentración intermedia (C3), que se consideró como testigo, para poder efectuar las correcciones (AOAC, 1995) y análisis estadísticos de los resultados. Otros tres pocillos de cada placa se emplearon para el estudio de cada una de las concentraciones (C1, C2, C4 y C5).

De esta manera, se obtuvieron 6 valores para cada concentración ensayada y 36 valores de la concentración considerada como testigo.



**Figura 2.** Diseño experimental empleado para estudiar las concentraciones inhibitorias mínimas en leche.

### III.1.3. Bioensayo de inhibición microbiológico en Placa de Petri

#### III.1.3.1. Equipos, reactivos y materiales

Los equipos necesarios para el desarrollo del bioensayo de difusión radial fueron los que se indican a continuación:

- Balanza analítica de precisión 0.0001 g (Scientech SA120, USA)
- Balanza sensibilidad 0.001 g (Scientech SP150, USA)
- Agitador magnético (Cole-Parmer Instrument Company USA, Model 4803-02)
- Baño termostático (Dalvo Model MAI4, Argentina)
- pHmetro con controlador de temperatura (Orion, Model 410A)

- Autoclave vertical tipo chamberland (Tecnología Científica, Argentina)
- Campana de flujo laminar (Sabella FVL-1300, Argentina)
- Estufa de cultivo (Hornos Eléctricos O.R.L.<sup>®</sup>, Argentina)
- Centrífuga de 2500 rpm (Rolco, Modelo 2036, Argentina)
- Los reactivos utilizados para la preparación han sido los siguientes:
- MnSO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O (N° 1440, Lote 727665, UCB<sup>®</sup>, Bruselas, Bélgica)
- NaCl (Cicarelli<sup>®</sup>, Argentina, Ref. 918110)
- Medio de cultivo Muller Hinton Agar (Biokar Dianostic, Allone, Beauvays Francia, Ref. BK048HA)
- Trimetoprim (TMP, Sigma, Ref. T7883)
- Medio de cultivo caldo nutritivo N° 2 (Merck<sup>®</sup>, Ref.105450)

Los materiales específicos utilizados en el método de placa de Petri han sido:

- Placas de Petri de 90 mm de diámetro
- Micropipetas automáticas de 200 µL, 1000 µL y 5000 µL
- Sacabocados metálico de 8 mm de diámetro interno
- Botes de vidrio de resistencia térmica de 100, 250, 500 y 1000 mL
- Tubos de vidrio de tapón “sero-tab”
- Además se empleó el material habitual del laboratorio (guantes de látex, pesa sustancias, viales eppendorf, probetas, matraces aforados, erlenmeyers, espátulas, pipetas de vidrio, etc.).

### III.1.3.2. Preparación de las suspensiones bacterianas a partir de cepas liofilizadas de formas esporuladas

Para la preparación de la suspensión bacteriana en forma esporulada de *G. thermoleovorans* se llevaron a cabo las siguientes etapas:

- *Recuperación del cultivo liofilizado:* para recuperar este cultivo, se abrió la ampolla que contiene esporas de *G. thermoleovorans* LMG-9823 (Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and cell cultures, Braunschweig, Germany) mediante una lima. Luego, se procedió a rehidratar la cepa añadiendo 1mL de caldo nutritivo TH (8 g/L peptona, 6g/L extracto de

levadura y 6 g/L NaCl a pH= 7.0) con una pipeta Pasteur y resuspendiendo todo el material. A continuación, se mantuvo en estufa a  $64 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 24 horas.

- *Preparación del medio de esporulación:* se utilizó agar nutriente Biokar con 31,3 mg/L de  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ . El medio se esterilizó en autoclave a  $120 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 15 minutos. Una vez estéril se dosificó en cantidades de 14 mL en placas de 90 mm de diámetro.
- *Cultivo y esporulación:* se tomó un volumen de 0,2 mL de suspensión inicial y se sembró con asa en superficie en cada placa con el medio de esporulación anteriormente preparado. Seguidamente se incubó a  $64^\circ\text{C}$  durante 72 h.
- *Recolección de las esporas:* las esporas obtenidas se recolectaron de la superficie del agar mediante la ayuda de una espátula, pipeta Pasteur y solución fisiológica (0,85% NaCl) estéril. La operación se repitió hasta recolectar un volumen aproximado de 3 mL de suspensión bacteriana por cada placa.
- *Observación de la esporulación:* se llevó a cabo una tinción simple para evaluar el grado de esporulación, y comprobar que el porcentaje de esporas era superior al 10% del total de bacterias.
- *Lavados:* la suspensión bacteriana se distribuyó en tubos Falcon de 50 mL, que fueron centrifugados a 3.000 rpm durante 10 minutos. A continuación, mediante decantación se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento mediante solución fisiológica y se centrifugó nuevamente. Esta operación se repitió tres veces.
- *Pasteurización:* con el objeto de mantener la suspensión bacteriana estable a lo largo del tiempo, se calentaron los tubos de vidrio que contenían la suspensión de esporas en un baño de agua caliente a  $82^\circ\text{C}$  durante 10 minutos.
- *Recuento de esporas:* el recuento se efectuó utilizando placas Petrifilm para gérmenes totales. Se realizaron diluciones  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-12}$  de la suspensión de trabajo.
- *Conservación:* una vez cuantificada la concentración de la suspensión de esporas, ésta se conservó en refrigeración ( $0-4^\circ\text{C}$ ) durante un período al menos un año, efectuando controles de viabilidad cada tres meses.

### III.1.3.3. Preparación del bioensayo en placas de Petri

Se utilizó como medio de cultivo Mueller Hinton agar fortificado con D-glucosa (10 g/l) en una proporción de 38 g/L de agua destilada. A continuación, se esterilizó en una autoclave a  $120\pm 1$  °C durante 15 minutos, previamente se ajustó el pH a  $8,5 \pm 0,1$ .

Una vez preparado el medio de cultivo se procedió a su inoculación con la suspensión de esporas en condiciones estériles de modo tal de obtener una concentración final de  $3.10^8$  esporas/mL de *G. thermoleovorans* LMG-9823. Luego de la adición del microorganismo en condiciones estériles a cada frasco con los medios de cultivo, se agitaron moderadamente para conseguir su homogeneidad. Con el fin de obtener un espesor de 2,2 mm, se depositó en las placas de Petri (90 mm de diámetro) un volumen de 14 mL de medio de cultivo.

Posteriormente, las placas se dejaron enfriar sobre una superficie plana nivelada a fin de obtener una capa de espesor uniforme. Una vez frío y solidificado, se realizaron las perforaciones (8 mm de diámetro) con ayuda de un sacabocados y pinzas para extracción del agar. Los pocillos debían presentar una separación entre ellos de 3 cm para que los halos inhibitorios no se superpusieran.

En cada pocillo, se dispuso un volumen de 70  $\mu$ L de muestra de leche fortificada con los antimicrobianos con ayuda de una micropipeta regulable previamente calibrada. A continuación, las placas con las muestras de leche se dejaron durante 30 minutos a temperatura ambiente para que tuviera lugar la predifusión de los antibióticos. Posteriormente, las placas de Petri se colocaron en una estufa de cultivo a 64°C- durante 6 horas.

### III.1.3.4. Interpretación de los resultados

Transcurrida la etapa de incubación de las placas en la estufa, se procedió a efectuar las mediciones de los halos inhibitorios donde no hubo crecimiento de microorganismos alrededor de los pocillos, mostrándose de este modo la sensibilidad de éstos a los diferentes antimicrobianos estudiados.

Para realizar las lecturas, las placas se colocaron sobre un fondo negro y se enfocaron con una fuente luminosa. Se empleó un calibre vernier con sensibilidad de  $\pm 0,1$  mm y se tomó la medida del diámetro de la zona de inhibición (incluido el pocillo de 8 mm) por duplicado, en aquellas partes más definidas de la circunferencia. Se

considero un incremento de 1 mm en los radios de las circunferencias de los halos de inhibición (diámetro = 10 mm) como el mínimo necesario para cuantificar el efecto. Haciendo uso de estas mediciones se calcularon las medias (M), desviaciones estandaradas (D.S) y coeficientes de variación ( CV= M/D.S \*100).

#### III.1.3.5. Análisis estadístico de los resultados

Los resultados de las medidas de los halos de inhibición obtenidos experimentalmente fueron introducidos en una hoja de cálculo Excel<sup>®</sup> (Excel, 2012) para su análisis con Stat-Graphics Centurion (Stat-Graphics, 2008). Se utilizó el Modelo de Regresión Lineal mediante la siguiente ecuación estadística:

$$Y_{ij} = \beta_0 + \beta_1 \log C_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde:  $Y_{ij}$ : variable dependiente (diámetro del halo de inhibición medido en mm),  $\beta_0$  y  $\beta_1$ : parámetros calculados por el modelo de regresión lineal simple,  $\log C_i$ : variable independiente (logaritmo decimal de la concentración de antibiótico medido en  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ),  $\varepsilon_{ij}$ : error residual del modelo.

A partir de esta ecuación, se calcularon los niveles de decisión de cada antibiótico como la concentración que produce un incremento de 2 mm en el radio del halo inhibitorio (diámetro de 12 mm).

### **III.2. ESTUDIO II: Bioensayo que utiliza *G. thermoleovorans* en microplacas de titulación**

En una primera etapa experimental se persiguió como objetivo disminuir el tiempo de respuesta de un bioensayo que utiliza *G. thermoleovorans* en placas de microtitulación mediante el incremento en la concentración de las esporas presentes en el medio de cultivo (Nagel y col., 2011). A continuación, se evaluó el efecto de la incorporación de ácido clavulánico en el medio de cultivo para disminuir los límites de detección de las penicilinas y, finalmente, se estudiaron los parámetros de calidad, especificidad y límite de detección de otros agentes antimicrobianos.

#### *III.2.1. Efecto de la concentración de esporas sobre el límite de detección de penicilina en leche y el tiempo de respuesta*

##### III.2.1.1. Preparación de las microplacas

Se prepararon duplicados de siete microplacas ELISA para analizar siete niveles de esporas de *G. thermoleovorans* ( $6.0 \cdot 10^7$ ,  $1.5 \cdot 10^8$ ,  $3.0 \cdot 10^8$ ,  $6.0 \cdot 10^8$ ,  $9.10^8$ ,  $1.2 \cdot 10^9$  y  $1.5 \cdot 10^9$  esporas/ml). Se utilizó como medio de cultivo Mueller Hinton enriquecido con 10 g/L de D-glucosa. Se adicionó una mezcla de indicadores redox constituida por negro brillante (200 mg/l) y azul de toluidina (10 mg/l). Este medio se fraccionó en siete alícuotas, a las cuales se les agregó un volumen de una suspensión de esporas de *G. thermoleovorans* de modo tal de obtener los niveles antes mencionados. En cada pocillo de la microplaca se colocó un volumen de 100  $\mu$ l de medio de cultivo. A continuación, las placas se sellaron y se mantuvieron a 4°C hasta su uso.

Límites de detección de penicilina: Con el propósito de evaluar el efecto de la concentración de esporas sobre los límites de detección y tiempo de incubación del bioensayo se ensayaron 16 réplicas de 12 concentraciones de penicilina (0, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30  $\mu$ g/l) utilizando dos microplacas por cada nivel de esporas.

Las microplacas se incubaron en baño de agua flotante a 64°C hasta viraje del indicador del negro a un color amarillo. Para cada nivel de esporas se apuntó el tiempo que demoró en producirse el viraje del indicador de las muestras negativas (leche sin fortificar) y se interpretaron los resultados en forma visual.

### III.2.1.2. Análisis estadístico de los resultados:

Se utilizó la opción stepwise del siguiente modelo de regresión logístico de segundo orden:

$$L_{ijk} = \text{logit} [ p_{ijk} ] = \beta_0 + \beta_1 [Pen]_i + \beta_2 \text{Log}[E]_j + \beta_{22} (\text{Log}[E])_{jj}^2 + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:  $L_{ijk}$  = modelo logístico,  $[P_{ijk}] = \text{logit} [Pp/(1-Pp)]$ : probabilidad de “frecuencia positivos/frecuencias de negativos”),  $\beta_0$  = ordenada al origen,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_{22}$  = parámetros estimados por el modelo,  $[Pen]_i$  = concentración penicilina en leche (i:12),  $\text{Log}[E]_j$  = transformación logarítmica de la concentración de esporas,  $(\text{Log}[E])_{jj}^2$  = cuadrado de la transformación logarítmica de la concentración de esporas,  $\varepsilon_{ijk}$  = error residual del modelo.

Para el estudio del efecto de concentración de esporas presentes en el medio de cultivo sobre el límite de detección (LD) del bioensayo se empleó el siguiente modelo, utilizando el paquete estadístico Stat-Graphics Centurion (Stat-Graphics, 2008).

$$LD = \beta_0 + \beta_1 * [E]^{1/2}$$

Por último, se modelizó la concentración de esporas “[E]” sobre el tiempo de incubación ( $T_i$ ) del bioensayo mediante la siguiente expresión:

$$T_{ij} = \beta_0 [E]_i^{\beta_1} + \epsilon_{ij}$$

### III.2.2. Efecto de la concentración de ácido clavulánico sobre los límites de detección de penicilinas en leche

Con el propósito de incrementar la sensibilidad de *G. thermoleovorans* hacia las penicilinas debido a su amplio uso en vacas lecheras durante la lactación, se evaluó el efecto de la incorporación de ácido clavulánico (ACLAV) en el medio de cultivo debido a su posible acción como inhibidor de las betalactamasas presentes en la bacteria-test.

#### III.2.2.1. Preparación del Bioensayo:

Se utilizó medio de cultivo Mueller Hinton (38 g/L) D-glucosa (10 g/L), negro brillante (200 mg/l) y azul de toluidina (10 mg/l) a pH = 8,5 con una concentración final de  $1.5 \cdot 10^9$  esporas/ml. El medio de cultivo se dividió en cuatro alícuotas con el propósito de analizar diferentes niveles de ACLAV (0, 2, 4 y 6 mg/L). De cada alícuota se prepararon diez microplacas (40 microplacas). Las muestras de leche se fortificaron con disoluciones de cinco penicilinas según se indica en Tabla 8. Luego, se ensayaron 16 réplicas de 12 concentraciones para cada uno de los antibióticos y nivel de ACLAV.

**Tabla 8.** Concentraciones de penicilinas en leche utilizadas para la optimización del bioensayo que emplea *G. thermoleovorans*

Penicilina	Concentraciones ( $\mu\text{g/L}$ )
Penicilina	0, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 15, 20, 30
Amoxicilina	0, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 15, 20, 30
Ampicilina	0, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 15, 20, 30
Cloxacilina	0, 30, 60, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 600, 800
Oxacilina	0, 30, 60, 90, 120, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 600

#### III.2.2.2 Análisis estadístico de los resultados:

Para analizar los efectos de la concentración de ACLAV, penicilinas y sus interacciones sobre la respuesta del bioensayo se empleó la opción stepwise del modelo de regresión logística contenido en el paquete estadístico Stat Graphics Centurión. Se

postuló el siguiente modelo interactivo que permite evaluar el posible efecto sinérgico entre cada una de las penicilinas presente en la leche y ACLAV.

$$L_{ijk} = \text{logit} [P_{ijk}] = \beta_0 + \beta_i [\text{Pen}]_i + \beta_j [\text{ACLAV}]_j + \beta_{ij} [\text{Pen}]_i [\text{ACLAV}]_j + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:  $L_{ijk}$  = modelo logístico;  $[P_{ijk}] = \text{logit} [P_p / (1-P_p)]$ : probabilidad de “respuesta positiva” / probabilidad de “respuesta negativa”);  $\beta_0, \beta_i, \beta_j, \beta_{ij}$ , = coeficientes estimados por el modelo logístico;  $[\text{Pen}]_i$  = concentración de penicilina en la leche ( $i=12$  niveles)  $[\text{ACLAV}]_j$  = concentración de ácido clavulánico ( $j=4$  niveles: 0, 2, 4 y 6  $\mu\text{g/l}$ ),  $[\text{Pen}]_i [\text{ACLAV}]_j$  = interacción entre la concentración de penicilina y ácido clavulánico,  $\varepsilon_{ijk}$  = error residual del modelo.

### III.2.2.3 Propiedades del bioensayo que utiliza *G thermoleovorans*

Se determinó la especificidad y los límites de detección en un bioensayo de respuesta dicotómica en placas de microtitulación que utiliza *G. thermoleovorans* para la detección de otros antibióticos en leche.

Elaboración de los bioensayos: se preparó medio de cultivo Mueller Hinton (38 g/L), D-glucosa (10 g/L) fortificado con una mezcla de indicadores (200 mg/L negro brillante y 10 mg/l azul de toluidina), ácido clavulánico (6 mg/L) y pH= 8,5. Luego fue inoculado con volumen de una disolución de *G. thermoleovorans* de forma tal de obtener una concentración final de  $1.5 \cdot 10^9$  esporas/mL.

Especificidad:

Se analizaron triplicados de 192 muestras de leche procedentes de animales que no fueron medicamentados ni recibieron alimentación con fármacos (IDF- FIL, 2002) sobre bioensayos que contenían 0, 2, 4, 6 y 8 mg/L de ACLAV en el medio de cultivo (4 bioensayos/nivel ACLAV). Los animales provenían de la explotación ganadera productora de leche La Matuza SRL, del Distrito Cululú, perteneciente al Departamento Las Colonias de la Provincia de Santa Fe (Santa Fe, Argentina). Se agregó un volumen de 50  $\mu\text{l}$  de cada muestra en los pocillos de los bioensayos y se incubó a 64°C por un tiempo de 1,5 hs.

La especificidad del método microbiológico se calculó como la frecuencia relativa porcentual de resultados negativos, haciendo uso de la siguiente expresión:

$$\text{Especificidad} = (\text{resultados negativos/muestras totales analizadas}) * 100$$



A su vez, a cada muestra de leche se le efectuaron determinaciones de composición química (materia grasa, proteínas, lactosa y sólidos totales), Recuentos de Células Somáticas (RCS) y Recuentos de Gérmenes totales (RGT) en el laboratorio lactológico LaRSA (Laboratorio Regional de Servicios Analíticos) dependiente de ALECOL (Asociación del Litoral de Entidades de Control Lechero). Se calcularon los principales parámetros estadísticos (promedio, desviación estándar, coeficiente de variación y rango) de los componentes químicos y transformaciones logarítmicas de los Recuentos de Células Somáticas (RCS) y Recuentos de Gérmenes Totales (RGT).

Estudio de límites de detección para otros antimicrobianos:

Se calcularon los límites de detección (LDs) de 26 antimicrobianos (5 betalactámicos, 4 cefalosporinas, 3 aminoglucósidos, 4 macrólidos, 3 quinolonas, 3 tetraciclinas y 4 sulfamidas) en leche, según las concentraciones detalladas en el (Tabla 9).

Para el análisis de los LDs, se ensayaron 16 réplicas de 12 concentraciones para cada uno de los antimicrobianos ensayados (52 bioensayos en total, 2 placas por cada antimicrobiano). En cada pocillo de la microplaca, se depositaron 50 µl de disolución de leche previamente enriquecida con el antibiótico a estudiar. Seguidamente, las microplacas se sellaron con bandas adhesivas y se colocaron a incubar a  $64 \pm 1$  °C durante 1,5hs.

- 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;  $\beta_0$ ,  $\beta_i$  = coeficientes estimados por el modelo de regresión logística,  $[A]_i$  = efecto de la concentración de antibiótico en la leche,  $\varepsilon_{ij}$  = error residual del modelo. Los límites de detección (LDs) se calcularon como aquella concentración de antibiótico que produce un 95% de resultados positivos en la curva dosis-respuesta (IDF-FIL, 1997, 2002; Althaus y col., 2002).

**Tabla 9.** Concentraciones de agentes antimicrobianos utilizadas para la determinación de los límites de detección del bioensayo que utiliza *G. thermoleovorans*.

Antimicrobiano	Concentraciones ( $\mu\text{g L}^{-1}$ o $\text{mg L}^{-1}$ )
<b>Betalactámicos</b>	
Penicilina “G”	0, 1, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.50, 4.0, 5.0, 6.0, 8.0, 10.0
Amoxicilina	0, 0.5, 1, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.50, 4.0, 5.0, 6.0, 8.0
Ampicilina	0, 1, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.50, 4.0, 5.0, 6.0, 8.0, 10.0
Cloxacilina	0, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140
Oxacilina	0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60
Cefadroxilo	0, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500
Cefalexina	0, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000
Cefoperazone	0, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500
Ceftiofur	0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 250
<b>Aminoglucósidos</b>	
Estreptomina	0, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6 *
Kanamicina	0, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 *
Neomicina	0, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000
<b>Macrolidos</b>	
Eritromicina	0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 250
Lincomicina	0, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135, 150, 165, 180
Tilosina	0, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80
Tilmicosina	0, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80
<b>Quinolonas</b>	
Ciprofloxacina	0, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 6, 8 *
Enrofloxacina	0, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 6, 8 *
Marbofloxacina	0, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 6, 8 *
<b>Tetraciclinas</b>	
Clortetraciclina	0, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 800, 1000
Oxitetraciclina	0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550
Tetraciclina	0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550
<b>Sulfamidas</b>	
Sulfadimetoxina	0, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200 *
Sulfametazina	0, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200 *
Sulfametoxazol	0, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200 *
Sulfatiazol	0, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200 *

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### IV.1. ESTUDIO I: Bioensayo de difusión radial en Placas de Petri con *G. thermoleovorans*

Para establecer los límites de detección de la placa que utiliza *G. thermoleovorans* como bacteria-test, se evaluaron previamente las Concentraciones Inhibitorias Mínimas (CIMs) para cada agente antimicrobiano, definido como la concentración de un antibiótico que produce un halo de inhibición detectable, es decir, que pueda ser medido. En este sentido, numerosos autores (Vacher y Jemmi, 1997; Currie y col., 1998; Tsai y Kondo, 2001, Calderón y col., 2006, Althaus y col., 2009) consideran como apreciable un incremento en el radio de la zona de inhibición de 1 mm.

Para nuestro estudio, en el cual se utilizó una perforación de 8 mm, se consideró como mínimo valor de lectura un diámetro del halo equivalente a 10 mm. Haciendo uso de estos valores de CIMs de cada antibiótico se procedió a evaluar el efecto de la concentración de cada fármaco sobre los diámetros de los halos inhibitorios y posteriormente se determinó el límite de detección para cada molécula analizada.

#### IV.1.1. Detección de penicilinas

Los valores medios y desviaciones estándar de los diámetros de los halos de inhibición obtenidos para las diferentes concentraciones de las cinco penicilinas en leche se muestran en la tabla 10.

En todos los casos se puede observar que los valores medios de los halos de inhibición aumentan en la medida que se incrementa la concentración de penicilinas en leche. Las moléculas de ampicilina y penicilina presentaron mayor diámetro de inhibición, señalando una mayor sensibilidad de *G. thermoeleovorans* para ambos antimicrobianos en leche.

Las desviaciones estándares, en general, no fueron bajas, al estar comprendidas entre 0,10 mm (8 µg/l de penicilina) y 0,69 mm (64 µg/l de ampicilina). Las mayores desviaciones estándares se obtuvieron para residuos de ampicilina en leche, señalando una mayor variabilidad en la respuesta de este fármaco, mientras que cloxacilina y oxacilina presentaron menores valores de desviaciones estándar (D.S. y coeficientes de variación), poniendo de manifiesto una mayor repetitividad en su respuesta.

**Tabla 10.** Valores medios y desviaciones estándares de los diámetros de los halos inhibitorios de penicilinas en leche medidos con *G. thermoleovorans*

Penicilinas	Concentraciones ( $\mu\text{g/l}$ )		Media (mm)	D.S. (mm)	C.V. (%)
Penicilina	C <sub>1</sub>	8	10,32	0,15	1,45
	C <sub>2</sub>	16	11,34	0,30	2,65
	C <sub>3</sub>	32	15,43	0,43	2,79
	C <sub>4</sub>	64	20,38	0,53	2,60
	C <sub>5</sub>	128	24,37	0,26	1,07
Amoxicilina	C <sub>1</sub>	8	10,17	0,10	0,98
	C <sub>2</sub>	16	11,10	0,34	3,06
	C <sub>3</sub>	32	14,15	0,50	3,53
	C <sub>4</sub>	64	17,16	0,36	2,10
	C <sub>5</sub>	128	21,17	0,49	2,31
Ampicilina	C <sub>1</sub>	16	10,09	0,18	1,78
	C <sub>2</sub>	32	13,65	0,65	4,76
	C <sub>3</sub>	64	15,79	0,69	4,37
	C <sub>4</sub>	128	19,12	0,25	1,31
	C <sub>5</sub>	256	21,82	0,42	1,92
Cloxacilina	C <sub>1</sub>	200	13,09	0,15	1,15
	C <sub>2</sub>	400	18,50	0,22	1,19
	C <sub>3</sub>	800	22,20	0,30	1,35
	C <sub>4</sub>	1600	26,49	0,15	0,57
	C <sub>5</sub>	3200	29,81	0,28	0,94
Oxacilina	C <sub>1</sub>	100	11,27	0,18	1,60
	C <sub>2</sub>	200	13,64	0,25	1,83
	C <sub>3</sub>	400	18,73	0,42	2,24
	C <sub>4</sub>	800	23,10	0,17	0,74
	C <sub>5</sub>	1600	27,62	0,41	1,48

D.S.: Desviación estándar. C.V.: Coeficiente de variación porcentual.

Por ello, cada vez que se desea validar este bioensayo para la detección de penicilinas en leche deberían utilizarse cualquiera de estas dos moléculas. También se observa en (Tabla 10) que para cada penicilina, las mayores D.S. se obtienen a la concentración C<sub>3</sub>, debido a que estas disoluciones se colocaron en cada placa de Petri y por lo tanto la variabilidad (repetitividad interplaca) fue más elevada con respecto a la repetitividad intraplaca de las demás concentraciones (C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>4</sub>, y C<sub>5</sub>) que se ensayaron solamente en las placas correspondientes (Figura 3).

Con respecto a los coeficientes de variación, se puede establecer que la repetitividad de este bioensayo para la detección de penicilinas en leche ha sido buena para las cinco penicilinas, ya que los coeficientes de variación resultaron en todos los

casos inferiores al 4,76 % (64 µg/l de ampicilina). El efecto de las transformaciones logarítmicas de las concentraciones de penicilinas en leche sobre los diámetros de los halos de inhibición de *G. thermoleovorans* determinados mediante el modelo de regresión lineal se muestran en la (Tabla 11).

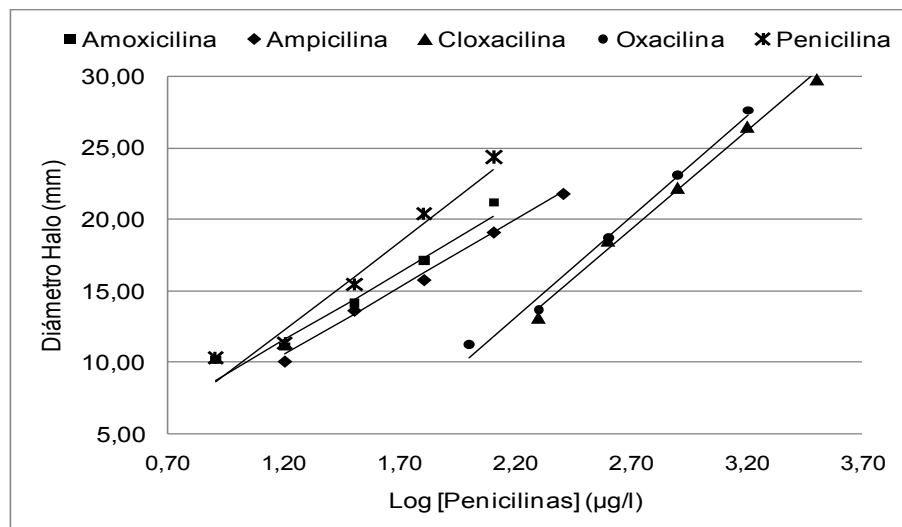
**Tabla 11.** Coeficientes del modelo de regresión que expresa el efecto de las concentraciones de penicilinas en leche sobre los diámetros de los halos inhibitorios medidos con *G. thermoleovorans*

Penicilinas	$D = \beta_0 + \beta_1 \text{ Log [Penicilinas]}$	R
Penicilina	$D = - 2,5465 + 12,3336 \text{ Log [Penicilina]}$	0,9732
Amoxicilina	$D = 0,1182 + 9,5266 \text{ Log [Amoxicilina]}$	0,9626
Ampicilina	$D = - 0,8558 + 9,4792 \text{ Log [Ampicilina]}$	0,9694
Cloxacilina	$D = - 17,8702 + 13,7639 \text{ Log [Cloxacilina]}$	0,9953
Oxacilina	$D = - 17,9600 + 14,1182 \text{ Log [Oxacilina]}$	0,9752

R: Coeficiente de regresión.

En todos los casos se manifiesta un incremento en los diámetros conforme aumenta la concentración de penicilinas en la muestra de leche. Los valores más elevados de pendientes se obtienen para cloxacilina (13,7639) y oxacilina (14,1182), en comparación con ampicilina (9,4792) y amoxicilina (9,5266).

Con respecto a los coeficientes de regresión, se puede establecer que fueron buenos, ya que están comprendidos entre 0,9626 (amoxicilina) y 0,9953 (cloxacilina), señalando un adecuado ajuste con el modelo lineal utilizado.



**Figura 3.** Efecto de las concentraciones de penicilinas ( $\mu\text{g/l}$ ) en leche sobre los diámetros de los halos inhibitorios (mm) del bioensayo en placas de Petri que emplea *G. thermoleovorans*.

A fin de visualizar el efecto de las transformaciones logarítmicas de las concentraciones de penicilinas en leche sobre los diámetros de los halos inhibitorios se construyó la Figura 3. Se aprecia que los diámetros de inhibición en el crecimiento de *G. thermoleovorans* crecen más rápidamente (mayor pendiente) para cloxacilina y oxacilina en comparación con las otras tres penicilinas.

Haciendo uso de las ecuaciones de regresión lineal (Tabla 12) se calcularon las concentraciones que producen un halo inhibitorio de 12 mm que corresponde a un incremento de 2 mm del radio del halo. También se muestran los Límites Máximos de Residuos (LMRs) establecidos por la Unión Europea para estas penicilinas en leche.

**Tabla 12.** Concentraciones de penicilinas en leche que producen un incremento de 2 mm en los radios inhibitorios de *G. thermoleovorans*

Penicilinas	Concentración( $\mu\text{g/L}$ )	LMR( $\mu\text{g/L}$ )
Penicilina	15	4
Amoxicilina	18	4
Ampicilina	23	4
Cloxacilina	148	30
Oxacilina	132	30

En la bibliografía consultada no se hallaron límites de detección o concentraciones inhibitorias de penicilinas cuando se utiliza *G. thermoleovorans* como bacteria-test.

Por ello, la discusión se realizará con *G. stearothermophilus* por tratarse de un microorganismo termofílico ampliamente utilizado para el control de antibióticos en leche. Al respecto, Tsai y Kondo (2001) obtienen un halo de inhibición superior a los 2 mm en el crecimiento para 6 µg/l de penicilina o 50 µg/l de amoxicilina en leche. Nouws y col. (1998) determinan un incremento en el radio del halo de inhibición de 2 mm para menores concentraciones de penicilinas en leche (3 µg/l de penicilina y 4 µg/l de amoxicilina, 30 µg/l de cloxacilina y 30 µg/l oxacilina) que los obtenidos en este trabajo para *G. thermoleovorans* (Tabla 12).

Por ello, en estudios posteriores se evaluará el posible efecto de la incorporación de ácido clavulánico como inhibidor de betalactamasas para mejorar los límites de detección de la penicilina.

#### *IV.1.2. Detección de cefalosporinas*

En Tabla 13 se muestran los valores medios y las desviaciones estándar de los diámetros de las zonas de inhibición obtenidos para diferentes concentraciones de cefalosporinas en leche cuando se emplea *G. thermoleovorans*.

Los residuos de cefadroxil, cefoperazone y ceftiofur deben estar presentes en la leche a un nivel de 100 µg/l para producir un halo inhibitorio apreciable, mientras que cefalexina debe hallarse a una mayor concentración (200 µg/l).

Al igual que en el caso de las penicilinas, el incremento en la concentración de cefalosporinas produce un aumento en el tamaño de la zona de inhibición. Para las cuatro cefalosporinas estudiadas, las mayores desviaciones estándares se presentan para la concentración C<sub>3</sub>, por haberse ensayado en todas las placas (variabilidad interplaca). La repetibilidad del método para las cuatro cefalosporinas estudiadas fue muy adecuada, ya que los coeficientes de variación porcentual resultaron inferiores al 3,76% (400 µg/l de cefadroxil).

**Tabla 13.** Valores medios y desviaciones estándares de los diámetros de los halos inhibitorios de cefalosporinas en leche medidos con *G. thermoleovorans*

Cefalosporinas	Concentraciones (µg/l)		Media (mm)	D.S. (mm)	C.V. (%)
Cefalexina	C <sub>1</sub>	200	14,24	0,31	2,18
	C <sub>2</sub>	400	18,30	0,19	1,04
	C <sub>3</sub>	800	22,15	0,29	1,31
	C <sub>4</sub>	1600	24,30	0,31	1,28
	C <sub>5</sub>	3200	26,99	0,11	0,41
Cefadroxil	C <sub>1</sub>	100	13,74	0,34	2,47
	C <sub>2</sub>	200	16,20	0,59	3,64
	C <sub>3</sub>	400	19,69	0,74	3,76
	C <sub>4</sub>	800	22,70	0,15	0,66
	C <sub>5</sub>	1600	25,96	0,21	0,81
Cefoperazone	C <sub>1</sub>	100	10,67	0,33	3,09
	C <sub>2</sub>	200	12,36	0,25	2,02
	C <sub>3</sub>	400	15,86	0,53	3,34
	C <sub>4</sub>	800	19,22	0,23	1,20
	C <sub>5</sub>	1600	23,09	0,18	0,78
Ceftiofur	C <sub>1</sub>	100	12,08	0,17	1,41
	C <sub>2</sub>	200	15,30	0,21	1,37
	C <sub>3</sub>	400	19,15	0,31	1,62
	C <sub>4</sub>	800	22,09	0,21	0,95
	C <sub>5</sub>	1600	25,51	0,46	1,80

D.S.: Desviación estándar. C.V%: Coeficiente de variación porcentual.

Para establecer una relación entre los diámetros de los halos inhibitorios de *G. thermoleovorans* y los logaritmos de las concentraciones de cefalosporinas en leche se ensayó el modelo de regresión lineal, cuyos resultados se muestran en (Tabla 14).

**Tabla 14.** Coeficientes del modelo de regresión que expresa el efecto de las concentraciones de cefalosporinas en leche sobre los diámetros de los halos inhibitorios medidos con *G. thermoleovorans*

Cefalosporinas	$D = \beta_0 + \beta_1 \text{ Log [Cefalosporinas]}$	R
Cefalexina	$D = -10,5359 + 11,0141 \text{ Log [Cefalexina]}$	0,9378
Cefadroxil	$D = - 6,8494 + 10,5822 \text{ Log [Cefadroxil]}$	0,9746
Cefoperazone	$D = - 11,3148 + 10,5342 \text{ Log [Cefoperazone]}$	0,9847
Ceftiofur	$D = - 10,1455 + 11,1801 \text{ Log [Ceftiofur]}$	0,9956

R: Coeficiente de regresión.



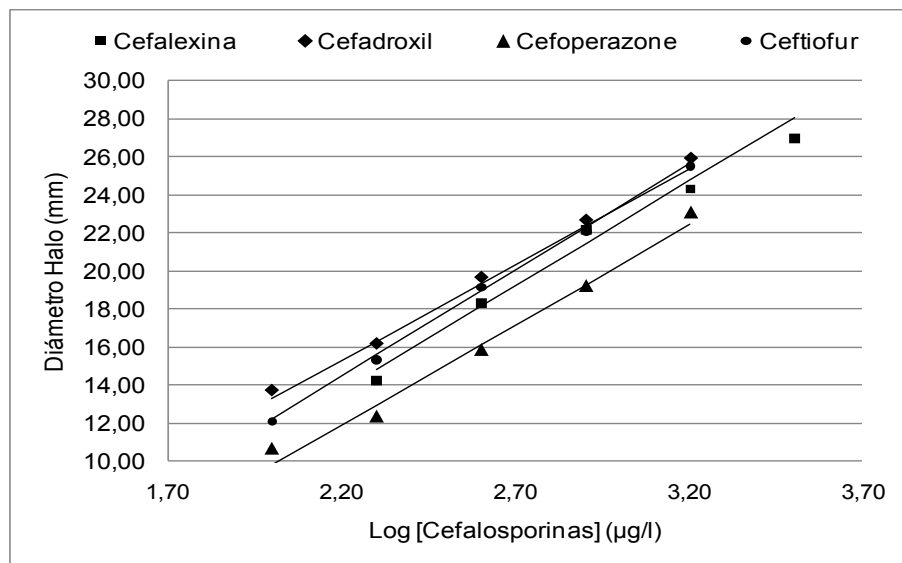
Los valores de los coeficientes  $\beta_1$  resultaron similares para las cuatro cefalosporinas, al estar comprendidos entre 10,5342 (cefoperazone) y 11,1801 (ceftiofur), poniendo de manifiesto una similar acción inhibitoria de estas moléculas hacia *G. thermoleovorans*. Por su parte, los ajustes logrados con el modelo de regresión han sido buenos con coeficientes de regresión comprendidos entre 0,9378 (cefalexina) y 0,9956 (ceftiofur).

En leche de oveja, Althaus y col., (2009) obtienen similares valores de los coeficientes  $\beta_1$  para cefadroxil (12,82), cefalexina (12,58) y cefoperazone (9,56) cuando emplea *G. stearothermophilus* como microorganismo de prueba.

La Figura 4 visualiza el efecto del incremento de las concentraciones de cefalosporinas en leche sobre los diámetros de los halos inhibitorios de *G. thermoleovorans*. Se puede apreciar el paralelismo de las rectas, hecho que señala, según se mencionara anteriormente, la similitud en la inhibición del crecimiento del microorganismo por parte de estas cuatro moléculas.

Mediante las ecuaciones de Tabla 14 se estimaron las concentraciones que producen un incremento en el radio inhibitorio de 2 mm. Estos valores, junto a los LMRs establecidos por la CEE para las cuatro cefalosporinas se resumen en (Tabla 15).

Los límites de detección de cefalexina (111  $\mu\text{g/l}$ ) y cefoperazone (163  $\mu\text{g/l}$ ) en leche para *G. thermoleovorans* resultaron levemente superiores a los niveles de 80  $\mu\text{g/l}$  y 55  $\mu\text{g/l}$  determinados respectivamente por Nouws y col., (1999a, b) cuando emplea *G. stearothermophilus*, mientras que Althaus y col., (2009) obtienen niveles de 100  $\mu\text{g/l}$  para ambas cefalosporinas en leche de oveja cuando emplean este microorganismo.



**Figura 4.** Efecto de las concentraciones de cefalosporinas ( $\mu\text{g/l}$ ) en leche sobre los diámetros de los halos inhibitorios (mm) del bioensayo en placas de Petri que emplea *G. thermoleovorans*.

Cuando se comparan los límites de detección del bioensayo de la Tabla 15 con los LMRs publicados por la legislación, se observa que son similares para cefalexina y ceftiofur en leche, mientras que *G. thermoleovorans* no presenta adecuada sensibilidad para detectar residuos de cefoperazone en leche.

**Tabla 15.** Concentraciones de cefalosporinas en leche que producen un incremento de 2 mm en los radios inhibitorios de *G. thermoeleovorans*.

Cefalosporinas	Concentración ( $\mu\text{g/L}$ )	LMR ( $\mu\text{g/L}$ )
Cefalexina	111	100
Cefadroxil	60	-
Cefoperazone	163	50
Ceftiofur	96	100

#### IV.1.3. Detección de aminoglucósidos

Los valores medios, desviación estándar y coeficientes de variación para las diferentes concentraciones de aminoglucósidos en leche se resumen en (Tabla 16). Al igual que en los casos anteriores, se observa un incremento en la respuesta (halos inhibitorios) en la medida que aumentan los niveles de estos antibióticos en leche.

Los valores más elevados de desviaciones estándares se observan para neomicina, especialmente para  $C_3$ , que presenta además mayor valor del coeficiente de

variación, debido principalmente a que esta concentración se ensayó en todas las placas de Petri y esta dispersión se contempla tanto debido a la repetitividad intra-placa como a la difusión dado por la reproducibilidad entre-placas.

**Tabla 16.** Valores medios y desviaciones estándares de los diámetros de los halos inhibitorios de aminoglucósidos en leche medidos con *G. thermoleovorans*

Aminoglucósidos	Concentraciones ( $\mu\text{g/l}$ )	Media (mm)	D.S. (mm)	C.V. (%)	
Estreptomina	C <sub>1</sub>	1000	10,93	0,34	3,11
	C <sub>2</sub>	2000	12,63	0,30	2,38
	C <sub>3</sub>	4000	15,32	0,22	1,44
	C <sub>4</sub>	8000	17,66	0,20	1,13
	C <sub>5</sub>	16000	20,23	0,17	0,84
Neomicina	C <sub>1</sub>	750	15,36	0,38	2,47
	C <sub>2</sub>	1500	16,18	0,24	1,48
	C <sub>3</sub>	3000	17,89	0,57	3,19
	C <sub>4</sub>	6000	19,36	0,25	1,29
	C <sub>5</sub>	12000	20,27	0,17	0,84
Kanamicina	C <sub>1</sub>	2000	11,91	0,16	1,34
	C <sub>2</sub>	4000	13,27	0,25	1,88
	C <sub>3</sub>	8000	16,34	0,28	1,71
	C <sub>4</sub>	16000	18,22	0,27	1,48
	C <sub>5</sub>	32000	22,14	0,19	0,86

D.S.: Desviación estándar. C.V.: Coeficiente de variación porcentual.

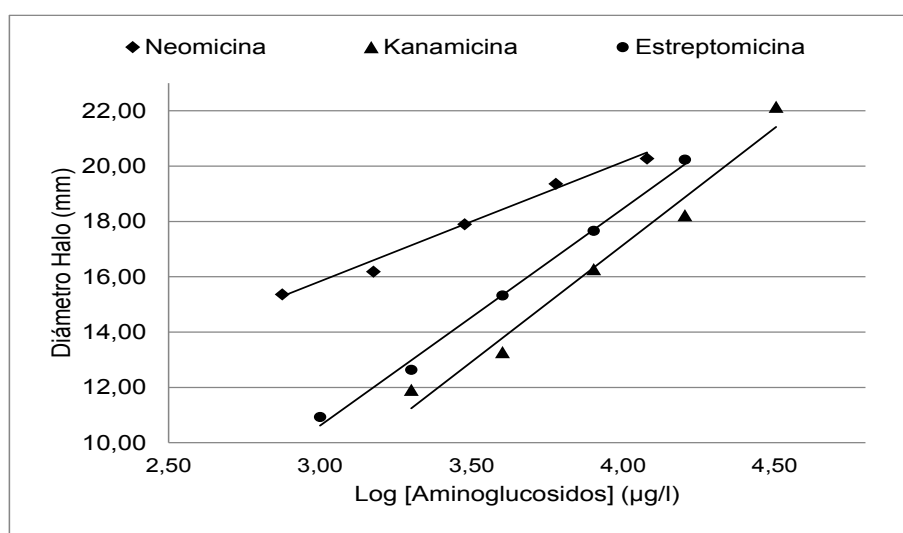
La aplicación del modelo de regresión lineal que permite establecer la función entre los diámetros de las zonas de inhibición de *G. thermoleovorans* y el logaritmo decimal de la concentración de macrólidos, permitió obtener las ecuaciones que se exponen en la (tabla 17).

Los ajustes calculados fueron buenos en los tres casos, con coeficientes de regresión que superan a 0,95. También se construyó la Figura 5 para visualizar la relación entre concentración de Aminoglucósidos y diámetros de los halos de inhibición.

**Tabla 17.** Coeficientes del modelo de regresión que expresa el efecto de las concentraciones de aminoglucósidos en leche sobre los diámetros de los halos inhibitorios medidos con *G. thermoleovorans*

Aminoglucósidos	$D = \beta_0 + \beta_1 \text{ Log [aminoglucósidos]}$	R
Estreptomicina	$D = - 12,9242 + 7,8471 \text{ Log [Estreptomicina]}$	0,9938
Neomicina	$D = 2,8799 + 4,3185 \text{ Log [Neomicina]}$	0,9588
Kanamicina	$D = - 16,6327 + 8,4451 \text{ Log [Kanamicina]}$	0,9797

R: Coeficiente de regresión.



**Figura 5.** Efecto de las concentraciones de aminoglucósidos ( $\mu\text{g/l}$ ) en leche sobre los diámetros de los halos inhibitorios (mm) del bioensayo en placas de Petri que emplea *G. thermoleovorans*.

Los límites de detección se exponen junto a los correspondientes LMRs en la (Tabla 18). Se observa que *G. thermoleovorans* presenta adecuada sensibilidad para detectar residuos de neomicina en leche, ya que el límite de detección es de  $130 \mu\text{g/l}$  en comparación con los  $1500 \mu\text{g/l}$  fijado como LMR por la legislación. Sin embargo, este microorganismo no posee adecuados niveles de detección para estreptomicina y kanamicina.

**Tabla 18.** Concentraciones de aminoglucósidos en leche que producen un incremento de 2 mm en los radios inhibitorios de *G. thermoleovorans*.

Aminoglucósidos	Concentración (µg/L)	LMR (µg/L)
Estreptomicina	1500	200
Neomicina	130	1500
Kanamicina	2450	150

En la bibliografía consultada no se reportan límites de detección de aminoglucósidos utilizando *G. thermoleovorans* como sensor biológico, sin embargo, Currie y col., (1998) logran detectar 12,5 µg/L de kanamicina y 25 µg/L de neomicina cuando emplean *Bacillus subtilis* BGA. Por el contrario, Tsai y Kondo (2001) obtienen niveles de detección más elevados (780 µg/L de kanamicina) al utilizar *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

En leche de oveja, Althaus y col., (2009) detectan 150 µg/L de kanamicina, 200 µg/L de estreptomicina y 500 µg/L de neomicina con un bioensayo en placas de Petri que hace uso de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 a pH = 8.0. y en virtud de los resultados vertidos en Tabla.18, no se recomienda utilizar *G. thermoleovorans* como sensor de los aminoglucósidos en leche por presentar elevados límites de detección, a excepción de neomicina que resulta muy sensible, siendo más adecuado el uso de *Bacillus subtilis*.

#### IV.1. 4. Detección de macrólidos y lincomicina

La correspondencia entre las concentraciones de macrólidos y lincomicina en leche con sus respectivos diámetros de inhibición de *G. thermoeleovorans* se presentan en Tabla 19, donde se puede apreciar también los valores de las desviaciones estándar y coeficientes de variación del bioensayo. Para todos los macrólidos y lincomicina ensayados, se evidencia un incremento de la variable respuesta cuando aumenta la concentración del antimicrobiano en leche. Los mayores valores de desviación estándar se obtienen para el caso de tilosina en comparación con el resto de las moléculas de este grupo. En forma similar, los coeficientes de variación resultaron más elevados para C<sub>2</sub> y C<sub>3</sub> de tilosina (4,24 y 3,81 %).

**Tabla 19.** Valores medios y desviaciones estándares de los diámetros de los halos inhibitorios de macrólidos y lincomicina en leche medidos con *G. thermoleovorans*

Macrólidos	Concentraciones ( $\mu\text{g/l}$ )		Media (mm)	D.S. (mm)	C.V. (%)
Eritromicina	C <sub>1</sub>	100	10,83	0,37	3,42
	C <sub>2</sub>	200	12,78	0,22	1,72
	C <sub>3</sub>	400	15,17	0,27	1,78
	C <sub>4</sub>	800	17,23	0,36	2,09
	C <sub>5</sub>	1600	19,21	0,34	1,77
Tilmicosina	C <sub>1</sub>	50	10,37	0,11	1,06
	C <sub>2</sub>	100	13,52	0,23	1,70
	C <sub>3</sub>	200	15,34	0,33	2,15
	C <sub>4</sub>	400	17,78	0,12	0,67
	C <sub>5</sub>	800	19,69	0,13	0,66
Tilosina	C <sub>1</sub>	50	10,11	0,13	1,29
	C <sub>2</sub>	100	12,75	0,54	4,24
	C <sub>3</sub>	200	15,73	0,60	3,81
	C <sub>4</sub>	400	17,50	0,31	1,77
	C <sub>5</sub>	800	20,82	0,30	1,44
Lincomicina	C <sub>1</sub>	150	12,20	0,19	1,56
	C <sub>2</sub>	300	13,04	0,10	0,77
	C <sub>3</sub>	600	16,76	0,37	2,21
	C <sub>4</sub>	1200	18,40	0,19	1,03
	C <sub>5</sub>	2400	20,43	0,53	2,59

D.S.: Desviación estándar. C.V.: Coeficiente de variación porcentual.

Las ecuaciones del modelo de regresión lineal para macrólidos (y lincomicina) se resumen en Tabla 20. Se aprecia que los coeficientes  $\beta_1$  para los tres macrólidos y lincomicina son similares y están comprendidos entre 7,0462 para eritromicina y 8,6942 para tilosina.

**Tabla 20.** Coeficientes del modelo de regresión que expresa el efecto de las concentraciones de macrólidos y lincomicina en leche sobre los diámetros de los halos inhibitorios medidos con *G. thermoleovorans*

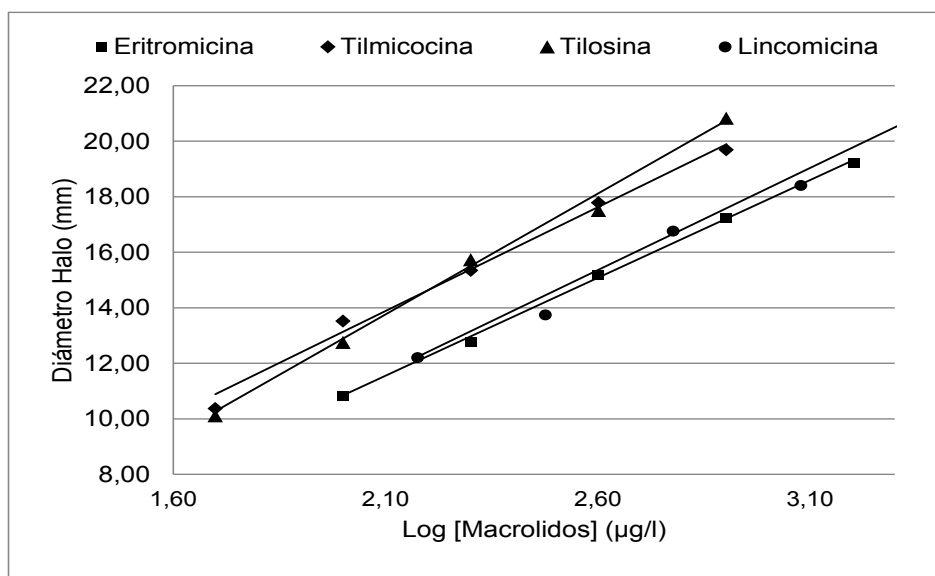
Macrólidos	$D = \beta_0 + \beta_1 \text{ Log [macrólidos y lincomicina]}$	R
Eritromicina	$D = - 3,2415 + 7,0462 \text{ Log [Eritromicina]}$	0,9918
Tilmicosina	$D = -1 ,8084 + 7,4743 \text{ Log [Tilmicosina]}$	0,9858
Tilosina	$D = - 4,4953 + 8,6942 \text{ Log [Tilosina]}$	0,9826
Lincomicina	$D = - 3,7491 + 7,2492 \text{ Log [Lincomicina]}$	0,9707

R: Coeficiente de regresión.

Althaus y col., (2009) cuando utilizan *M. luteus* ATCC 9341 como bacteria test para detectar residuos de macrólidos en leche de oveja, obtienen valores similares de los coeficientes  $\beta_1$  para tilosina (8,59) y más elevados para eritromicina (11,57) señalando una mejor detección por parte de *M. luteus* en comparación con *G. thermoleovorans*.

También se observa que los ajustes logrados mediante el modelo de regresión lineal a las transformaciones logarítmicas de las concentraciones de macrólidos en leche han sido buenos con coeficientes de regresión comprendidos entre 0,9707 (lincomicina) y 0,9918 (eritromicina) poniendo de manifiesto la adecuación del modelo utilizado.

Para visualizar el efecto de los incrementos de las concentraciones de macrólidos y lincomicinas en leche sobre los diámetros de los halos inhibitorios se construyó la Figura 6. Se observa un paralelismo entre las cuatro rectas en concordancia con los valores de los parámetros  $\beta_1$  de Tabla 20.



**Figura 6.** Efecto de las concentraciones de macrólidos y lincomicina ( $\mu\text{g/l}$ ) en leche sobre los diámetros de los halos inhibitorios (mm) del bioensayo en placas de Petri que emplea *G. thermoleovorans*.

Los límites de detección del bioensayo para macrólidos en leche calculados mediante las ecuaciones de la Tabla 20 se muestran en Tabla 21 junto a los LMRs. Se aprecia que este método presenta buena capacidad de detección para los residuos de tilosina, tilmicosina y lincomicina en leche, puesto que los LDs son cercanos a los respectivos LMRs; aunque la capacidad de detección de eritromicina es superior al LMR.

**Tabla 21.** Concentraciones de macrólidos y lincomicina en leche que producen un incremento de 2 mm en los radios inhibitorios de *G. thermoleovorans*.

Macrólidos	Concentración ( $\mu\text{g/L}$ )	LMR ( $\mu\text{g/L}$ )
Eritromicina	146	40
Tilmicosina	70	50
Tilosina	79	50
Lincomicina	150	150

Nouws y col., (1998) observan que niveles de 30  $\mu\text{g/L}$  de eritromicina o 500  $\mu\text{g/L}$  de tilosina en leche producen un halo de inhibición de 22 mm (perforación de 16 mm) cuando utilizan el *M. luteus* ATCC 9341 como microorganismo de prueba. En forma similar, Althaus y col., (2009) obtienen un halo de 21,8 mm (perforación de 16



mm) para 40 µg/L de eritromicina en leche de oveja, no pudiendo detectar los residuos de tilosina al LMR cuando utiliza *M. luteus*.

Por todo ello, y teniendo en consideración los límites de detección de los macrólidos y lincomicina en leche Tabla 21, así como los LMRs establecidos por la CEE, se puede establecer que *G. thermoleovorans* es un microorganismo de prueba con adecuada sensibilidad para esta familia de antibióticos, pudiendo, en el caso de la tilosina, detectar niveles más bajos que *M. luteus* recomendada como bacteria-test para esta familia de antimicrobianos.

#### *IV.1. 5. Detección de quinolonas*

En Tabla 22 se presenta el efecto de la concentración de las quinolonas sobre el diámetro de inhibición en el crecimiento de *G. thermoleovorans*. Para las tres quinolonas se observa que los tamaños de los halos de inhibición aumentan en la medida que se incrementa la concentración de quinolonas en la leche. Si bien las concentraciones necesarias para obtener halos medibles son elevadas, los mayores diámetros se producen para los residuos de ciprofloxacina con una concentración de 32000 µg/L.

Las desviaciones estándares fueron bajas en todos los casos, con coeficientes de variación inferiores al 4%. Cabe destacar que, según se señalara para otros grupos de antimicrobianos, las mayores variaciones se observan para la concentración intermedia ( $C_3$ ) por tratarse de un nivel que se utilizó en todas las placas.

**Tabla 22.** Valores medios y desviaciones estándares de los diámetros de los halos inhibitorios de quinolonas en leche medidos con *G. thermoleovorans*

Quinolonas	Concentraciones ( $\mu\text{g/l}$ )	Media (mm)	D.S. (mm)	C.V. (%)	
Ciprofloxacina	C <sub>1</sub>	2000	12,93	0,12	0,93
	C <sub>2</sub>	4000	16,21	0,19	1,17
	C <sub>3</sub>	8000	19,11	0,73	3,82
	C <sub>4</sub>	16000	22,34	0,19	0,85
	C <sub>5</sub>	32000	25,08	0,13	0,52
Enrofloxacina	C <sub>1</sub>	2000	9,45	0,12	1,27
	C <sub>2</sub>	4000	11,19	0,15	1,34
	C <sub>3</sub>	8000	12,82	0,42	3,28
	C <sub>4</sub>	16000	16,75	0,25	1,49
	C <sub>5</sub>	32000	19,32	0,27	1,40
Marbofloxacina	C <sub>1</sub>	2000	9,17	0,10	1,09
	C <sub>2</sub>	4000	11,23	0,19	1,69
	C <sub>3</sub>	8000	13,52	0,49	3,62
	C <sub>4</sub>	16000	16,27	0,18	1,11
	C <sub>5</sub>	32000	18,20	0,19	1,04

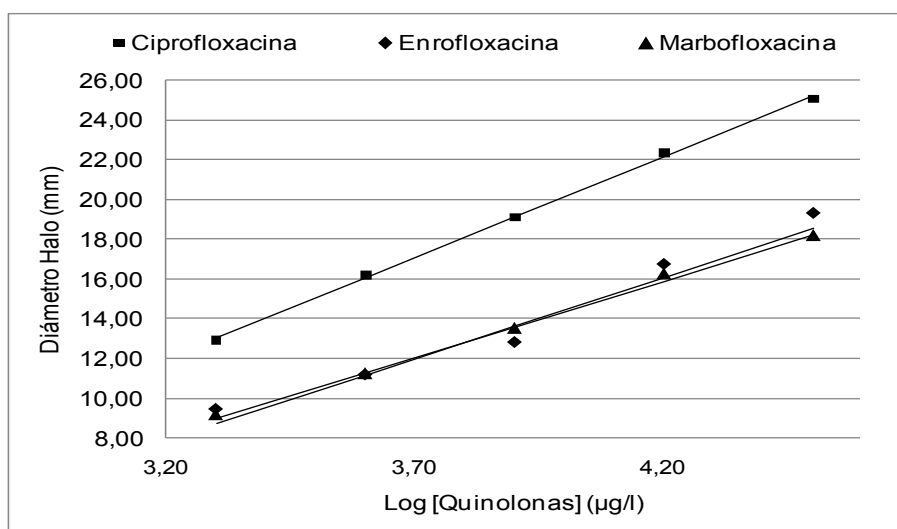
D.S.: Desviación estándar. C.V.: Coeficiente de variación porcentual.

Los modelos matemáticos citados en la Tabla 23 expresan el efecto de las concentraciones de quinolonas en leche sobre los diámetros de inhibición, así como las gráficas de la Figura 7 ponen de manifiesto un comportamiento similar para estos antibióticos en lo que respecta a su capacidad para inhibir del crecimiento de esta bacteria-test, puesto que los valores de los coeficientes  $\beta_1$  fueron similares para ciprofloxacina (10,106), enrofloxacina (8,1941) y marbofloxacina (7,6736). También los ajustes obtenidos mediante el modelo de regresión han sido buenos, con coeficientes de regresión superiores al 0,94.

**Tabla 23.** Coeficientes del modelo de regresión que expresa el efecto de las concentraciones de quinolonas en leche sobre los diámetros de los halos inhibitorios medidos con *G. thermoleovorans*

Quinolonas	$D = \beta_0 + \beta_1 \text{ Log [Quinolonas]}$	R
Ciprofloxacina	$D = - 20,317 + 10,106 \text{ Log [Ciprofloxacina]}$	0,9882
Enrofloxacina	$D = - 18,3573 + 8,1941 \text{ Log [Enrofloxacina]}$	0,9470
Marbofloxacina	$D = - 16,3649 + 7,6736 \text{ Log [Marbofloxacina]}$	0,9546

R: Coeficiente de regresión.



**Figura 7.** Efecto de las concentraciones de quinolonas ( $\mu\text{g/l}$ ) en leche sobre los diámetros de los halos inhibitorios (mm) del bioensayo en placas de Petri que emplea *G. thermoleovorans*.

Los límites de detección calculados mediante las ecuaciones de la Tabla 23 acompañados de los LMRs para las tres quinolonas se resumen en Tabla 24. Los niveles de detección son muy elevados en comparación con los valores fijados por la legislación como permitidos, de allí que este microorganismo no pueda utilizarse para detectar residuos de quinolonas en leche.

**Tabla 24.** Concentraciones de quinolonas en leche que producen un incremento de 2 mm en los radios inhibitorios de *G. thermoleovorans*.

Quinolonas	Concentración ( $\mu\text{g/L}$ )	LMR ( $\mu\text{g/L}$ )
Ciprofloxacina	1580	100
Enrofloxacin	5070	100
Marbofloxacina	4970	50

No se han encontrados valores de capacidades de detección o sensibilidades hacia quinolonas por parte de *G. thermoleovorans* en la bibliografía consultada. No obstante, para otro microorganismo termofílico ampliamente estudiado como *G. stearothermophilus* var. *calidolactis*, Althaus y col., (2009) señalan la formación de halos inhibitorios para 4000  $\mu\text{g/L}$  de enrofloxacin en leche de oveja.

#### IV.1. 6. Detección de tetraciclinas

El efecto de la concentración de tetraciclinas en leche sobre los diámetros de los halos de inhibición del método que emplea *G. thermoleovorans* se resumen en la Tabla 25. Para las tres tetraciclinas analizadas se observó un incremento en la zona de inhibición a medida que aumentan sus concentraciones, con diferencias estadísticas significativas ( $p < 0,05$ ).

Los mayores halos inhibitorios se producen cuando la leche contiene oxitetraciclina, en comparación con la clortetraciclina y tetraciclina que poseen menor acción inhibitoria puesto que deben estar presentes a mayores niveles para producir halos apreciables. Nuevamente, para cada tetraciclina, los mayores coeficientes de variación se presentan para la concentración intermedia ( $C_3$ ) por tratarse de un nivel ensayado en todas las placas. La repetitividad de los resultados ha sido buena, debido a que los coeficientes de regresión siempre fueron inferiores al 3% (Tabla 25).

**Tabla 25.** Valores medios y desviaciones estándares de los diámetros de los halos inhibitorios de tetraciclinas en leche medidos con *G. thermoleovorans*

Tetraciclinas	Concentraciones ( $\mu\text{g/l}$ )	Media (mm)	D.S. (mm)	C.V. (%)
Clortetraciclina	$C_1$	800	11,13	0,10
	$C_2$	1600	12,10	0,15
	$C_3$	3200	14,07	0,22
	$C_4$	6400	15,22	0,27
	$C_5$	12800	16,28	0,28
Oxitetraciclina	$C_1$	100	11,29	0,33
	$C_2$	200	13,30	0,19
	$C_3$	400	15,74	0,38
	$C_4$	800	18,73	0,27
	$C_5$	1600	22,31	0,35
Tetraciclina	$C_1$	400	11,76	0,19
	$C_2$	800	13,10	0,23
	$C_3$	1600	14,97	0,41
	$C_4$	3200	18,09	0,18
	$C_5$	6400	21,27	0,22

D.S.: Desviación estándar. C.V%.: Coeficiente de variación porcentual.

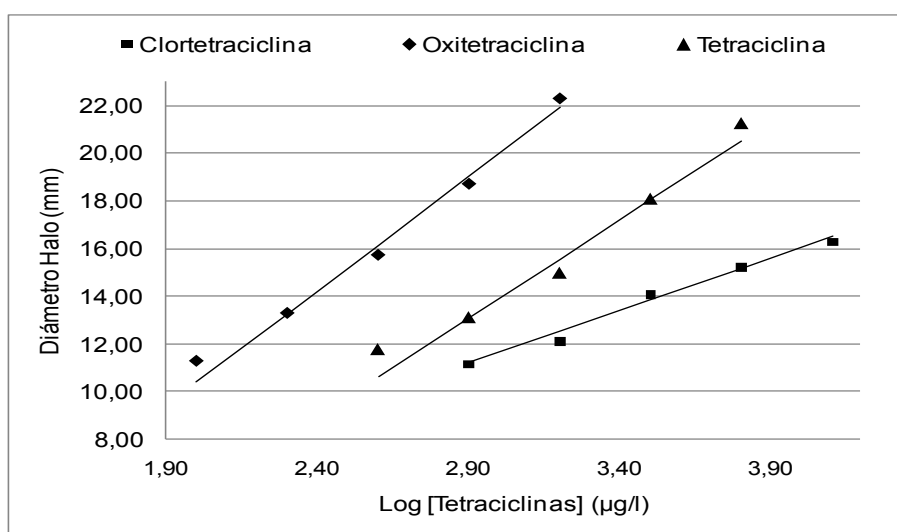
La utilización del modelo de regresión lineal aplicado a las tres tetraciclinas señaló las ecuaciones que se resumen en Tabla 26 y se representan en Figura 8.

**Tabla 26.** Coeficientes del modelo de regresión que expresa el efecto de las concentraciones de tetraciclinas en leche sobre los diámetros de los halos inhibitorios medidos con *G. thermoleovorans*

Tetraciclinas	$D = \beta_0 + \beta_1 \text{ Log [Tetraciclinas]}$	R
Clortetraciclina	$D = - 1,4945 + 4,3813 \text{ Log [Clortetraciclina]}$	0,9749
Oxitetraciclina	$D = - 8,7897 + 9,5872 \text{ Log [Oxitetraciclina]}$	0,9787
Tetraciclina	$D = - 10,8461 + 8,2421 \text{ Log [Tetraciclina]}$	0,9628

R: Coeficiente de regresión.

Los ajustes mediante el modelo lineal fueron buenos con coeficientes de regresión superiores a 0,96. Por su parte, oxitetraciclina (9,5872) presentó mayor valor del coeficiente  $\beta_1$  en comparación con tetraciclina (8,2421) y clortetraciclina (4,3813) poniendo de manifiesto una mayor sensibilidad de *G. thermoleovorans* hacia la primera tetraciclina, hecho que se evidencia en Figura 8 por la mayor pendiente de este antibiótico en la recta halo inhibitorio vs Logaritmo de concentración.



**Figura 8.** Efecto de las concentraciones de tetraciclinas ( $\mu\text{g/l}$ ) en leche sobre los diámetros de los halos inhibitorios (mm) del bioensayo en placas de Petri que emplea *G. thermoleovorans*.

Por ello, el límite de detección de este antibiótico es menor que los niveles calculados para las otras dos tetraciclinas (Tabla 27) y resultó cercano al valor establecido como LMR ( $100 \mu\text{g/L}$ ).

Si bien, no se han reportado límites de detección de tetraciclinas por *G. thermoleovorans*, se debe señalar que *G. stearothermophilus* tampoco presenta buena sensibilidad para estos antimicrobianos en leche, puesto que deben estar presentes en concentraciones de 1000 µg/L de tetraciclina o 2000 µg/L de oxitetraciclina para producir un incremento de 2 mm en los diámetros de los halos inhibitorios (Althaus y col., 2009).

**Tabla 27.** Concentraciones de tetraciclinas en leche que producen un incremento de 2 mm en los radios inhibitorios de *G. thermoleovorans*.

Tetraciclinas	Concentración (µg/L)	LMR (µg/L)
Clortetraciclina	1200	100
Oxitetraciclina	147	100
Tetraciclina	590	100

Por estos motivos se sugiere el empleo de *B. cereus* ATCC 11778 para la detección de residuos de tetraciclinas en leche. Con este microorganismo de prueba, Althaus y col., (2009) detectan 36 µg/L de clortetraciclina 107 µg/L de oxitetraciclina o 120 µg/L de tetraciclina en leche de oveja. Aunque Tsai y Kondo (2001) obtienen un incremento en el radio del halo de inhibición de 2 mm para concentraciones de 780 µg/L de oxitetraciclina y 200 µg/L de clortetraciclina en leche de vaca.

#### IV.1.7. Detección de sulfamidas

En el presente estudio se analizaron concentraciones elevadas de sulfadimetoxina, sulfametazina, sulfametoxazol, sulfatiazol (200 400 600 800 1200 mg/l) y no se produjeron halos inhibitorios a estos niveles. Por ello, se puede establecer que estos quimioterápicos no afectan el crecimiento del *G. thermoleovorans*. Sería conveniente que en estudios posteriores se evaluase el posible efecto sinérgico de las sulfamidas con trimetropim a fin de analizar el efecto antimicrobiano de la combinación de ambos fármacos.

## IV.2 ESTUDIO II: Bioensayo que utiliza *G. thermoleovorans* en microplacas de titulación

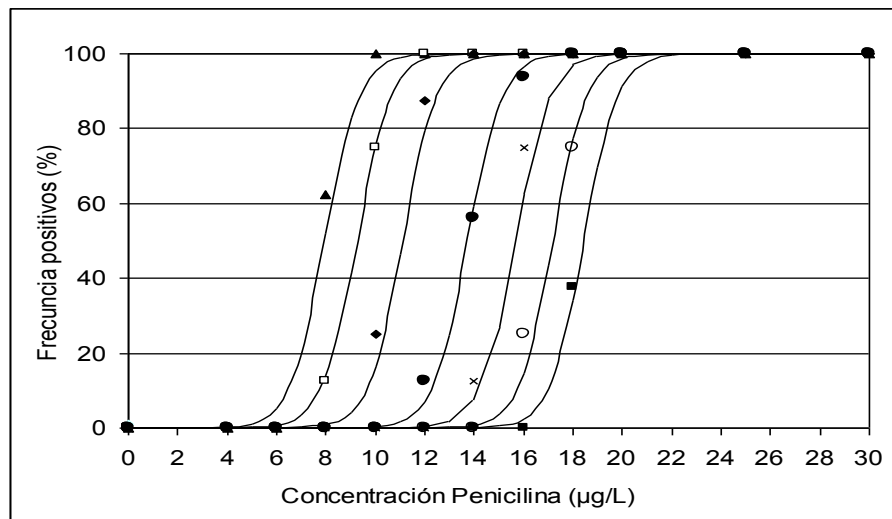
### IV.2.1. Efecto de la concentración de esporas sobre el límite de detección de penicilina en leche y el tiempo de respuesta.

Los resultados de la aplicación del modelo logístico a las frecuencias relativas del bioensayo utilizado con muestras de leche fortificadas con penicilina, señalan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) para las variables concentración de "PEN" (742,067), "Log[E]" (19.6466) y  $(\text{Log}[E])^2$  (24.1159). La ecuación que relaciona las frecuencias de resultados positivos del bioensayo como una función de las variables predichas por el modelo logístico es la siguiente:

$$\text{Logit [P]} = -383,0290 + 1,49518 [\text{PEN}] + 97,6756 \text{Log [E]} - 6,42305 (\text{Log [E]})^2$$

(C=85.9%)

La Figura 9 muestra las curvas logísticas construidas mediante la aplicación de la ecuación anterior para diferentes niveles de esporas. A partir de esta gráfica se deduce que un aumento en la concentración de esporas origina un corrimiento de las curvas dosis-respuesta hacia mayores concentraciones de PEN.



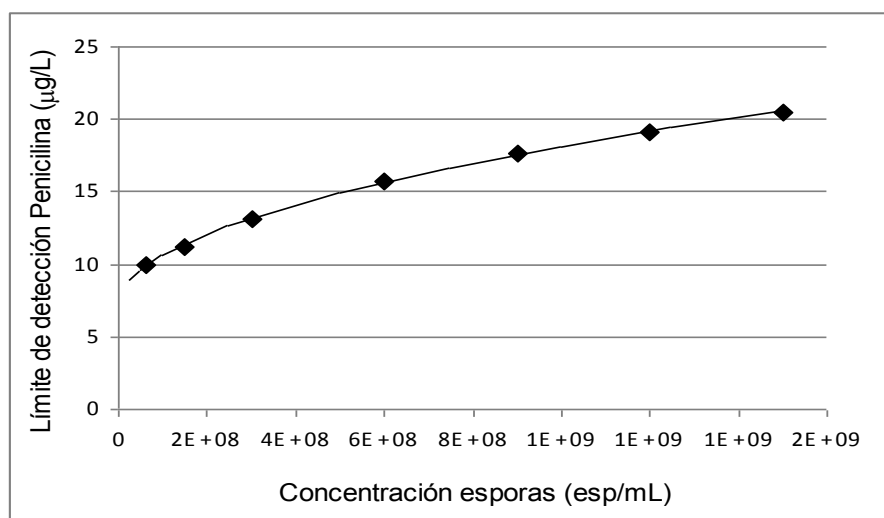
**Figura 9.** Efecto de la concentración de esporas sobre la curva dosis-respuesta de penicilina en leche analizadas mediante el bioensayo *G. thermoleovorans* (▲: Log [E]= 7.8; □: Log [E]= 8.2; ◆: Log [E]= 8.5; ●: Log [E]= 8.8; x: Log [E]= 8.9; ○: Log [E]= 9.1; ■: Log [E]= 9.2).

Los límites de detección de los bioensayos calculados a partir del modelo logístico se muestran en la Tabla 28. Haciendo uso de los LDs se construyó la Figura 10 donde se observa que el incremento del “Log [E]” en el medio de cultivo produce un aumento en los LDs. La ecuación matemática que presenta el efecto de “Log[E]” sobre los LDs del bioensayo es la siguiente:

$$LD = 7,1717 + 0,0003460 * [E]^{1/2} \quad R^2 = 0.9958$$

**Tabla 28** Efecto de Log [E] sobre los límites de detección de penicilina en leche y el tiempo de respuesta.

Conc. Esporas (esp 10 <sup>7</sup> /ml)	LD (µg/l)	Tiempo (h)
6 10 <sup>7</sup>	10,00	3,75
15 10 <sup>7</sup>	11,20	2,5
30 10 <sup>7</sup>	13,10	2,16
60 10 <sup>7</sup>	15,75	1,75
90 10 <sup>7</sup>	17,65	1,5
120 10 <sup>7</sup>	19,15	1,33
150 10 <sup>7</sup>	20,50	1,25

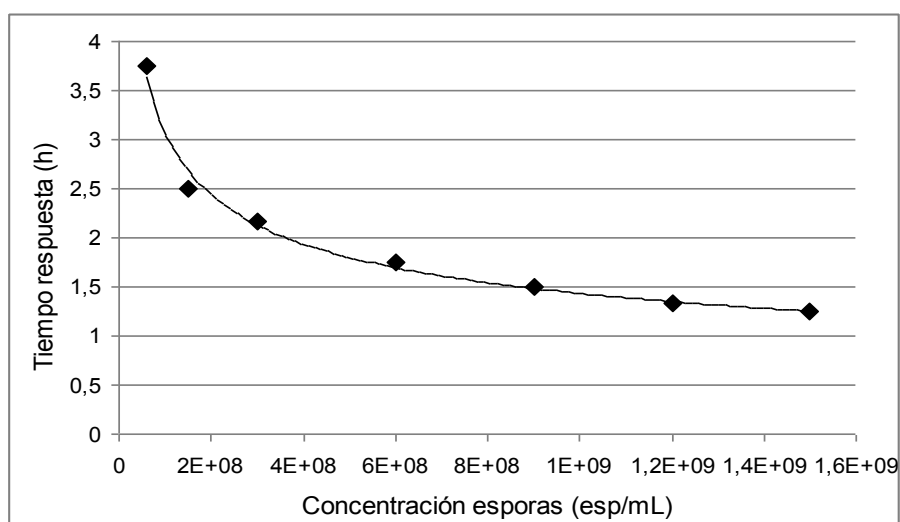


**Figura 10** Efecto de la concentración de esporas sobre los límites de detección de Penicilina en leche utilizando un bioensayo con *G thermoleovorans*.



El tiempo de incubación necesario para producir el cambio en la respuesta de los indicadores presenta un comportamiento inverso. En efecto, un incremento en “[E]” produce un mayor cambio en el potencial redox del medio de cultivo, acompañado de cambio de color de los indicadores redox y una disminución en el tiempo de respuesta de bioensayo. Por ello, en la Figura 11 se muestra el efecto que produce “[E]” sobre “Ti” (tiempo de incubación) del método. El incremento de la concentración de esporas disminuye el tiempo de respuesta hasta valores comprendidos entre 1.3 y 1.25 horas. La expresión matemática que relaciona el tiempo de incubación como una función del “[E]” es la siguiente:

$$Ti = 1329,5[E]^{-0,3297} R^2 = 0,9919$$



**Figura 11.** Efecto de la concentración de esporas sobre el tiempo de respuesta de bioensayo con *G. thermoleovorans* utilizado para la detección de penicilina en leche.

#### *IV.2.2. Efecto de la concentración de ácido clavulánico sobre los límites de detección de penicilinas en leche*

La tabla 29 resume los resultados obtenidos mediante el procedimiento stepwise del modelo de regresión logístico con interacción. Se observa que los niveles de ácido clavulánico (ACLAV) presentes en el medio de cultivo afectaron en forma significativa ( $p < 0.0001$ ) a la respuesta del bioensayo para las cinco penicilinas ensayadas.

**Tabla.29.** Valores de  $\chi^2$  y probabilidad para los diferentes factores que afectan la respuesta de los bioensayos elaborados con ACLAV para la detección de penicilinas

	[Bts]		[ACLAV]		[Bts]*[ACLAV]	
	Valor “ $\chi^2$ ”	Valor “p”	Valor “ $\chi^2$ ”	Valor “p”	Valor “ $\chi^2$ ”	Valor “p”
Betalactámicos						
Penicilina "G"	<b>314,0160</b>	<b>0,0001</b>	<b>88,8562</b>	<b>0,0001</b>	0,3763	0,5396
Amoxicilina	<b>311,1270</b>	<b>0,0001</b>	1,46196	0,2266	<b>296,8010</b>	<b>0,0001</b>
Ampicilina	<b>287,8270</b>	<b>0,0001</b>	<b>62,1981</b>	<b>0,0001</b>	0,9231	0,3367
Cloxacilina	<b>297,6130</b>	<b>0,0001</b>	<b>95,2973</b>	<b>0,0001</b>	1,4872	0,2226
Oxacilina	<b>329,6800</b>	<b>0,0001</b>	<b>179,7530</b>	<b>0,0001</b>	0,4168	0,5185

Bts: Antibióticos Betalactámicos, ACLAV: Ácido Clavulánico, Bts\*ACLAV: interacción entre los antibióticos betalactámicos y el ácido clavulánico.

Si bien las penicilinas poseen un mecanismo de acción similar, como inhibidores de la transpeptidación durante la síntesis de peptidoglucano de la pared celular de las bacterias, su acción con el ácido clavulánico (ACLAV) fue diferente dependiendo de la molécula analizada. Por su parte, el efecto de ACLAV y ampicilina, cloxacilina o penicilina G fue relacionado con un modelo aditivo al igual que cloranfenicol – tetraciclinas (Nagel y col., 2009, 2011). Por otro lado, la adición de ácido clavulánico y amoxicilina mostraron un efecto sinérgico como en el caso de las sulfamidas-trimetoprim (Paredes Gago, 2013; González-Villa y col, 2012; Villarroel y Yohanna, 2012).

Los coeficientes obtenidos para los cinco betalactámicos (Bts) por medio del modelo de regresión logístico se presentan en la Tabla 30. Los valores de los coeficientes “ $\beta_1$ ” señalan un aumento en la frecuencia de resultados positivos en la medida que aumenta la concentración de Bts en la leche. Valores elevados de coeficiente “ $\beta_1$ ” (1.4673 para PENG y 1.1420 para AMPI) indican que pequeños incrementos en su concentración producirán grandes aumentos en la frecuencia de resultados positivos, mientras que bajos valores de  $\beta_1$  (0,0524 para CLOXA) indican que se requieren mayores aumentos en sus concentraciones para alcanzar el 100% de resultados positivos.

De forma similar, los coeficientes “ $\beta_2$ ” muestran la magnitud de la acción antimicrobiana causada por el ACLAV en forma independiente. Debido a la similitud en los valores de estos coeficientes para las cuatro Bts, al estar comprendidos entre

$\beta_2=0.0023$  (AMPI) y  $\beta_2=0.00388$  (OXA), se pone de manifiesto una acción antimicrobiana semejante por parte del ACLAV. Este hecho puede atribuirse a que es un inhibidor de las betalactamasas presentes en los microorganismos resistentes a las penicilinas, que actúan en forma aditiva a la acción bactericida de BTs.

**Tabla 30** Ecuaciones logísticas de las curvas dosis-respuestas de betalactámicos para los bioensayos preparados con diferentes niveles de ácido clavulánico.

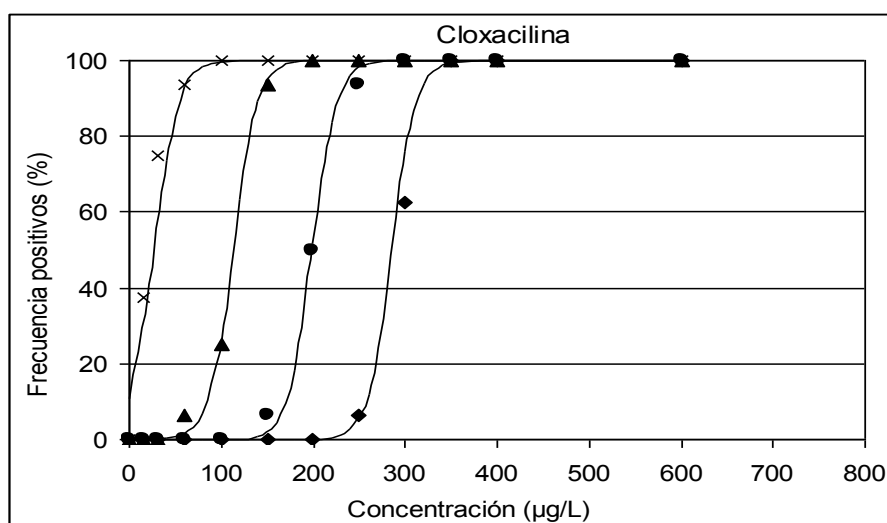
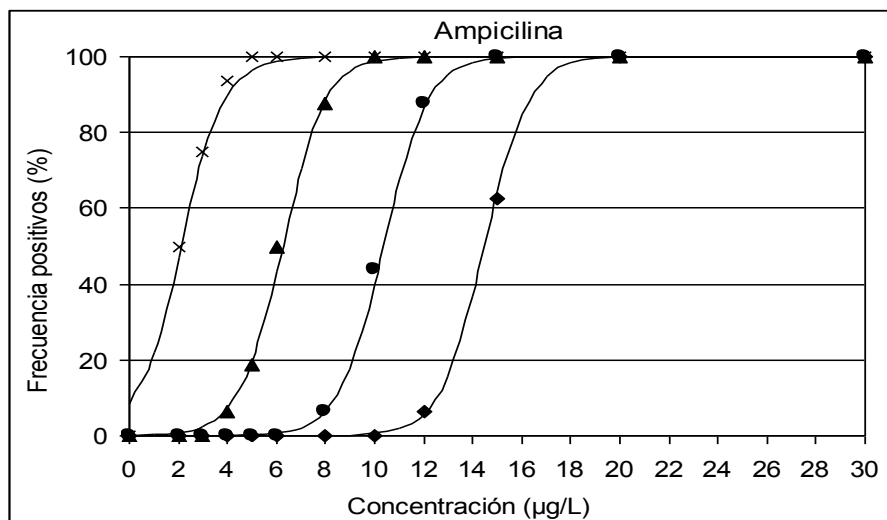
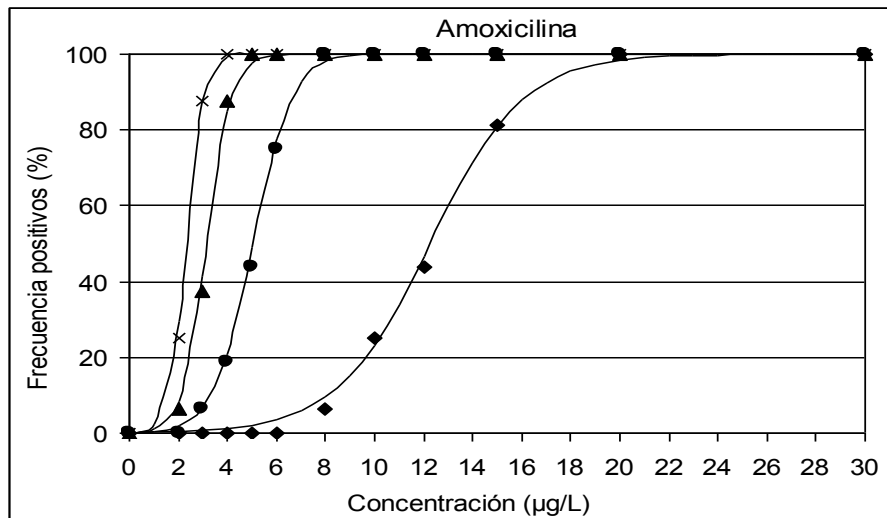
Bts	Logit [P] = $\beta_0 + \beta_1$ [Bts] + $\beta_2$ [ACLAV] + $\beta_3$ [BTs] [ACLAV]	C
PENG	Logit [P] = -21,8936+1,4673 [PENG]+0,0031 [ACLAV]	91,8
AMO	Logit [P] = -6,4930+0,5295 [AMO]+0,0004 [AMO] [ACLAV]	87,6
AMPI	Logit [P] = -16,5339+1,1420 [AMPI]+0,0023 [ACLAV]	89,7
CLOXA	Logit [P] = -22,426+0,0524 [CLOXA]+0,0034 [ACLAV]	92,8
OXA	Logit [P] = -24,4321+0,0789 [OXA]+0,0038 [ACLAV]	92,6

Bts: Betalactámicos, amo: Amoxicilina, ampi: Ampicilina, cloxa: Cloxacilina, oxa: Oxacilina, peng: Penicilina G, aclav: Ácido Clavulánico, C: Coeficiente de concordancia %

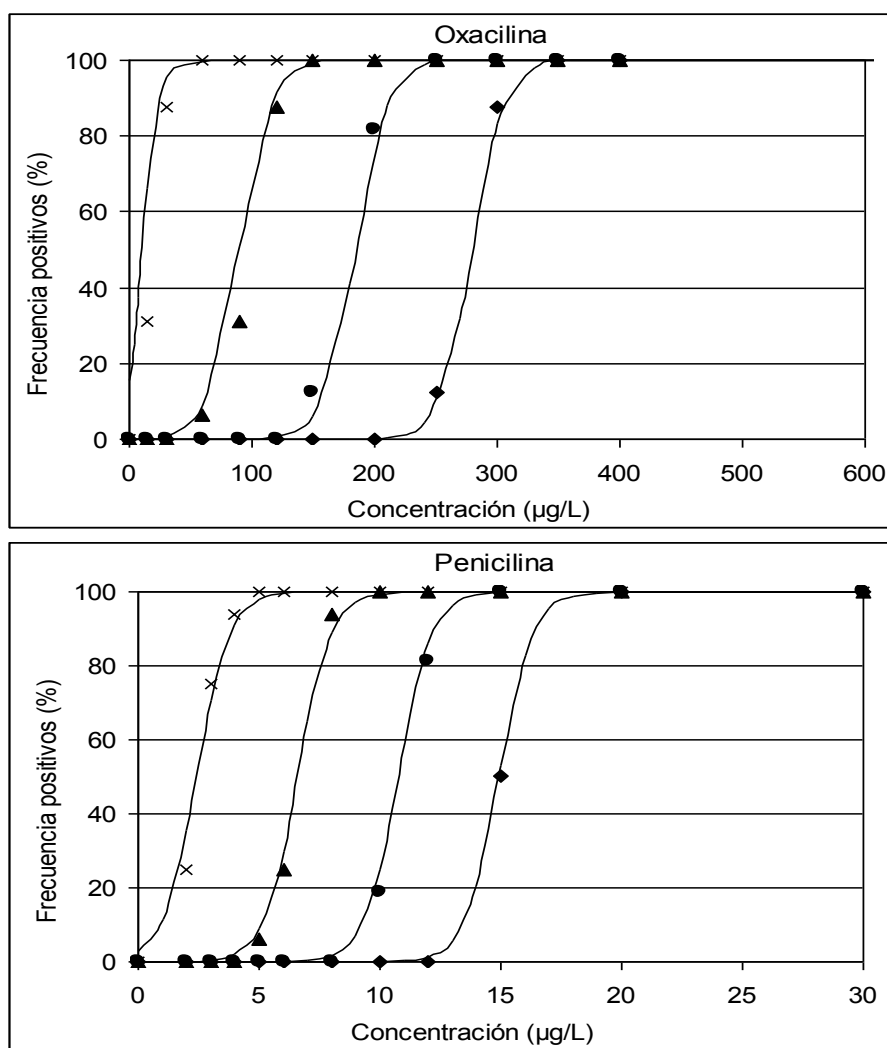
El modelo de regresión logística de amoxicilina, señala que existe un efecto sinérgico entre el antibiótico y ACLAV presente en el medio de cultivo, es decir la acción antimicrobiana de la combinación de estas drogas es mayor que la suma de sus simples efectos individuales.

Además, los coeficientes de concordancia fueron altos, situándose entre 97.6% (AMO) y 92.80% (AMPI), hecho que demuestra un buen ajuste logrado por el modelo logístico (Tabla 30).

La Figura 12 muestra el efecto de las concentraciones de BTs y ACLAV sobre la frecuencia relativa de resultados positivos, así como las curvas construidas por medio del modelo de regresión logístico de la Tabla 30. Un aumento en la concentración del ACLAV produce un desplazamiento de la curva dosis-respuesta hacia concentraciones más bajas, mejorando la sensibilidad del bioensayo hacia las penicilinas. Además, se observa que niveles de ACLAV equivalentes a 6 mg/l no producen un incremento en el intercepto de las curvas dosis-respuesta, es decir, no aumentan la frecuencia de resultados “falsos-positivos” al bioensayo.



**Figura 12** Curvas dosis-respuesta de los antibióticos betalactámicos para diferentes concentraciones de ácido clavulánico en el medio de cultivo (♦ ACLAV: 0 mg/L, ● ACLAV: 2 mg/L, ▲ ACLAV: 4 mg/L, X ACLAV: 6 mg/L).



**Figura 12** (cont) Curvas dosis-respuesta de los antibióticos betalactámicos para diferentes concentraciones de ácido clavulánico en el medio de cultivo (♦ ACLAV: 0 mg/L, ● ACLAV: 2 mg/L, ▲ ACLAV: 4 mg/L, X ACLAV: 6 mg/L).

Para el caso específico de la curva dosis respuesta de amoxicilina (Figura 12), se pone de manifiesto el sinergismo entre el antibiótico y ACLAV puesto que, se evidencia un incremento en las pendientes de las curvas dosis-respuestas conforme aumenta la concentración de ácido clavulánico en el medio de cultivo.

En la Tabla 31, se resumen los límites de detección de los bioensayos elaborados con diferentes niveles de ACLAV calculados por medio del modelo logístico y el criterio propuesto por IDF-FIL (2002), junto con los valores de los LMRs. La incorporación de 6 mg/l de ACLAV al medio de cultivo produce una disminución en los

LDs cercano al 80% comparado con bioensayos sin ACLAV. De esta forma, el uso de ACLAV en este nivel permite detectar concentraciones de BTs cercanas a los establecidos por la legislación, a excepción de cloxacilina que se encuentra en 2 veces su LMR.

**Tabla 31.** Efecto de la concentración de ACLAV en el bioensayo sobre los límites de detección de betalactámicos en leche

Betalactámicos	Concentración ACLAV (mg/L)				LMR *
	0	2	4	6	
Penicilina "G"	17	13	9	4	4
Amoxicilina	18	7	5	3	4
Ampicilina	17	13	9	5	4
Cloxacilina	320	240	150	70	30
Oxacilina	315	220	140	30	30

\* LMR ( $\mu\text{g/l}$ ), Limite Máximo de residuo de Ácido Clavulánico.

#### IV.2.3. Propiedades del bioensayo que utiliza *G thermoleovorans*

##### IV.2.3.1. Especificidad:

Los valores de composición química (materia grasa, proteínas, sólidos totales) y recuentos de células somáticas (RCS) para 192 muestras de leche procedentes de animales no tratados se exponen en la Tabla 32. Los valores medios se encuentran dentro de los parámetros normales para la leche bovina en Argentina.

**Tabla 32** Parámetros estadísticos de los componentes químicos de la leche.

Componente	Valor Medio	D.S	C.V
Materia grasa	3,03	0,79	0,26
Proteinas	3,35	0,30	0,09
Lactosa	4,90	0,24	0,05
Solidos no grasos	9,03	0,46	0,05
Sólidos Totales	12,06	0,98	0,08
Log RCS	96,56	104,11	1,08

D:S: Desviación standard: C:V: Coeficiente de variación

Los resultados obtenidos fueron analizados por duplicado estas mediante los bioensayos elaborados con diferentes niveles de ACLAV, se muestran en (Tabla 33).

**Tabla 33.** Efecto de la concentración de ácido clavulánico en el medio de cultivo sobre la especificidad de los bioensayos.

ACLAV (mg/L)	Número Muestras	Positivo	Negativo	Especificidad (%)
0	192	0	192	100
2	192	0	192	100
4	192	0	192	100
6	192	2	190	98,9
8	192	10	182	94,7

ACLAV: ácido clavulánico; Especificidad= resultados positivos/número de muestras.

Se observa que la selectividad de los bioensayos fortificados con 0, 2, 4 y 6 mg ACLAV/L es similar y cercana al 100 %. Por el contrario, el menor valor de especificidad se obtuvo cuando el bioensayo se fortifica con 8 mg ACLAV/L (94.7%).

Se debe considerar que un buen método debe poseer adecuada sensibilidad para detectar el antimicrobiano presente en la muestra de leche sin disminuir su especificidad. Por ello, el empleo de 8 mg ACLAV/L resulta perjudicial, ya que incrementa la frecuencia de resultados “falsos positivos” al método. Para la determinación de los límites de detección del resto de antimicrobianos en leche se elaborarán bioensayos con una concentración de 6 mg/L de ACLAV en el medio de cultivo.

#### IV.2.3.1. Límites de detección del bioensayo GT:

*IV.2.3.2.1 Betalactámicos:* los coeficientes de regresión logística, las curvas dosis respuestas y los límites de detección de antibióticos betalactámicos en leche se presentan en la (tabla 34) y sus gráficos en las (Figura 13 y Figura 14). Se observa un adecuado ajuste del modelo de regresión logística, ya que los coeficientes de concordancia se encuentran comprendidos entre 79,6% para Cefoperazone y 89,4% para Ceftiofur. Los términos correspondientes al parámetro “ $\beta_1$ ” fueron más elevados para las penicilinas que para las cefalosporinas, poniendo de manifiesto una mayor sensibilidad de *G. thermoleovorans* para detectar betalactámicos, ya que pequeños

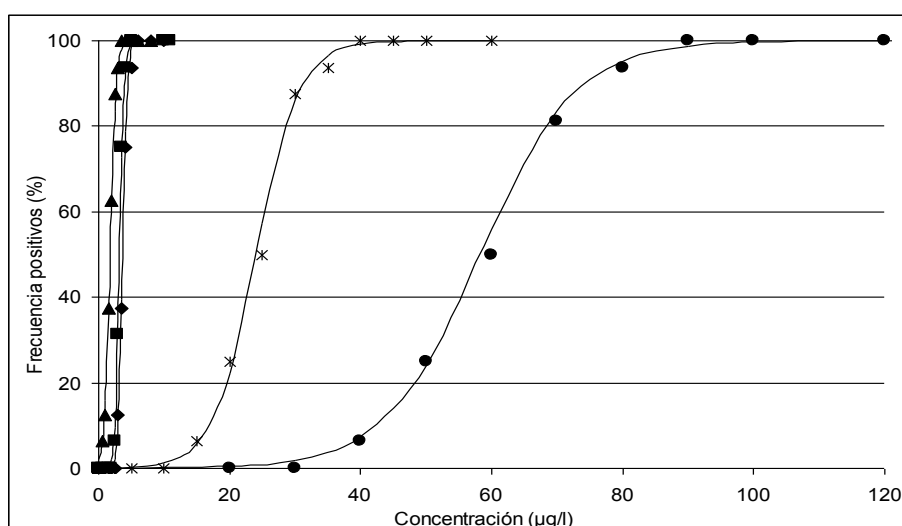
incrementos en sus concentraciones producen un aumento de la frecuencia de resultados positivos al método (Figuras 13 y 14).

**Tabla 34.** Coeficientes del modelo de regresión logística para las curvas dosis respuestas del Bioensayo GT analizado con antibióticos betalactámicos en leche.

Betalactámicos	Logit [P] = $\beta_0 + \beta_1$ [Betalactámico]	C
<i>Penicilinas</i>		
Penicilina “G”	Logit [P]= -10,3617 + 3,2416 [PEN]	86,6
Amoxicilina	Logit [P] = -3,8556 + 2,1906 [AMO]	79,8
Ampicilina	Logit [P] = -12,4939 + 3,4496 [AMP]	87,4
Cloxacilina	Logit [P]= -8,0573 + 0,1383 [CLOXA]	84,9
Oxacilina	Logit [P]= -7,41855 + 0,3083 [OXA]	86,0
<i>Cefalosporinas</i>		
Cefadroxil	Logit [P]= -3,5502 + 0,0347 [CXL]	84,8
Cefalexina	Logit [P]= -6,7816 + 0,0202 CLX]	85,7
Cefoperazone	Logit [P]= -3,0361 + 0,0245 [CPZ]	79,6
Ceftiofur <sup>®</sup>	Logit [P]= -4,3879 + 0,0518 [CFR]	89,4

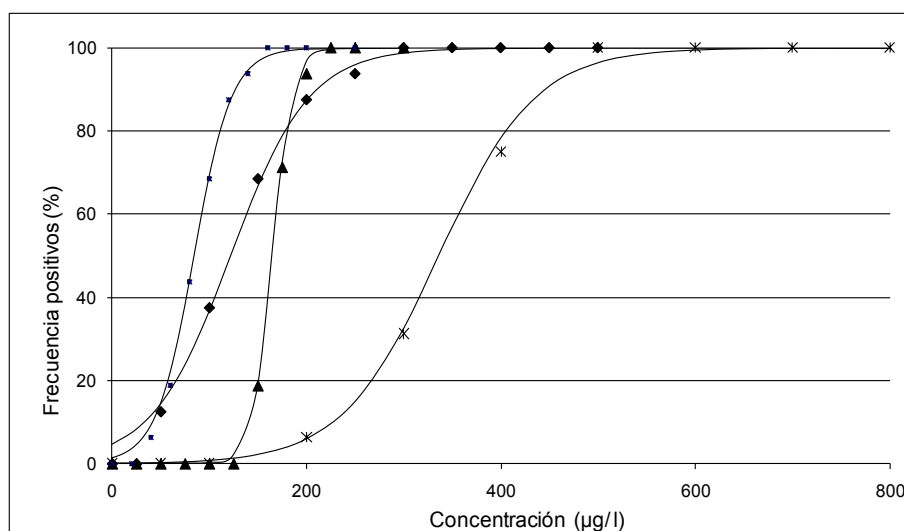
PEN: penicilina, AMO: amoxicilina, AMP: ampicilina, CLOXA: cloxacilina, OXA: oxacilina, CXL: cefadroxil, CLX: cefalexina, CPZ: cefoperazone, CFR: ceftiofur, C: concordancia porcentual.

Además, dentro de las penicilinas, se observa que ampicilina posee el mayor coeficiente “ $\beta_1$ ”, seguido de penicilina, amoxicilina, cloxacilina y oxacilina.



**Figura 13.** Curvas dosis respuestas de penicilinas en leche analizadas por el Bioensayo GT. (■: penicilina, ▲: amoxicilina, ◆: ampicilina, ●: cloxacilina, X: oxacilina).





**Figura 14.** Curvas dosis respuestas de cefalosporinas de leche analizadas por el Bioensayo GT. (▲: cefadroxil, X: cefalexina, ◆: cefoperazone, ■: ceftiofur<sup>®</sup>).

Las figuras dosis respuesta (Figura 13 y Figura 14) visualizan el efecto que presentan las penicilinas y cefalosporinas analizadas. Al igual que lo que se comentara anteriormente, pequeñas concentraciones de penicilinas dan como resultado grandes incrementos en las respuestas positivas al método poniendo de manifiesto una elevada sensibilidad por parte del microorganismo para la detección de este tipo de sustancias. Por el contrario, se necesitan concentraciones superiores a 150 µg/l de cefalosporinas para lograr el 100 % de frecuencias positivas.

**Tabla 35.** Límites de detección de antibióticos betalactámicos en leche mediante el Bioensayo GT.

Betalactámico	LD	LMR
Penicilina "G"	4	4
Amoxicilina	3	4
Ampicilina	4	4
Cloxacilina	80	30
Oxacilina	34	30
Cefadroxil	195	-
Cefalexina	480	100
Cefoperazone	240	50
Ceftiofur	140	100

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

Cuando se comparan las LD de cada antibiótico con sus correspondientes LMR, resulta evidente que el método permite detectar residuos de penicilina, amoxicilina, ampicilina, oxacilina y ceftiofur en leche a niveles cercanos a sus respectivos LMR, mientras que el resto de betalactámicos (cloxacilina, cefalexina, cefoperazone) deben estar presentes en concentraciones superiores a sus LMR para ser detectadas por el método.

Por su parte, Nagel (2009) obtiene LD ligeramente inferiores para penicilina (3 µg/l), cloxacilina (42 µg/l) y oxacilina (17 µg/l), pero superiores para amoxicilina (9 µg/l) y ampicilina (7 µg/l), cuando analiza los límites de detección de un método que utiliza *G. stearothermophilus* como bacteria-test.

Amoxicilina presenta límites similares a los obtenidos por Charm y Ruth (1993), Zorraquino (1997b, 1998) y IDF-FIL (2010) cuando utilizan el método BRT® AiM (3-5 µg/l), aunque Zaadhof y col., (1997) informaron un LD para esta penicilina comprendida entre 20 y 30 µg/l, superior a la obtenida para el Bioensayo GT.

Para el método Delvotest® SP, Honkanen y col., (1995), Lacroix (1995) y IDF-FIL (2010) obtienen niveles de detección de amoxicilina similares (4, 6 y 3 µg/l, respectivamente) a los reportados para el Bioensayo GT, aunque otros autores señalan valores superiores a los de Tabla 35 para el mismo antibiótico. Así, por ejemplo, Gardner y col., (1996) y Sischo (1996) obtienen concentraciones de 11-18, 11 y 8 µg/l, respectivamente.

En forma similar, la ampicilina presentó un LD cercano (4 µg/l) a los valores calculados por otros autores (Heeschen y Blüthgen, 1995; Zorraquino, 1997b, 1998; IDF-FIL, 2010) para el método BRT® AiM (2-5 µg/l).

Cuando muestras de leche que contienen residuos de ampicilina son analizadas por el método Delvotest® SP, Luitz y col. (1995), Lacroix (1995) y FIL-IDF (2010) señalan niveles más bajos (3 - 5 µg/l), sin embargo, otros autores (Charm y Ruth, 1993; Honkanen y col., 1995; Gardner y col., 1995; Sischo, 1996) obtienen para el método Delvotest® SP, LD más elevados (6-10 µg/l), próximos a los calculados para el Bioensayo GT.

Cloxacilina, por su parte, mostró un LD de 3 x LMR (80 µg/l) para el bioensayo GT, resultando superior a los 30-50 µg/l publicados por diferentes autores (Jaskch, 1988; Heeschen, 1993; Heeschen y Blüthgen, 1995; Zorraquino, 1997 y Analytic in

Milch, 1998; IDF-FIL, 2010), aunque Charm y Ruth (1993) calcularon un valor similar (100 µg/l) para el método BRT<sup>®</sup> AiM.

Cuando se emplea el método microbiológico Delvotest<sup>®</sup> SP, cloxacilina es detectada en un rango de 20-30 µg/l (Van Os y Beukers, 1980; Honkanen y col., 1996; Lacroix, 1995; Gardner y col., 1995; Luitz y col., 1995; IDF-FIL, 2010). No obstante, otros estudios señalan LDs más cercanas a los valores obtenidos para el Bioensayo GT, tales como 50 µg/l (Charm y Ruth, 1993) y 41-81 µg/l (Senyk y col., 1990).

Penicilina (antibiótico más utilizado en el ganado bovino de leche) presenta un LD igual a su LMR, aunque diferentes autores obtienen niveles inferiores para el método BRT<sup>®</sup> AiM, que oscilan entre 1-3 µg/l (Heeschen y Blüthgen, 1995; Frank, 1995; Zorraquino, 1997, 1998; IDF-FIL, 2010), 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).

Por otra parte, el método Delvotest<sup>®</sup> SP presenta un LD de penicilina en leche de 2.5 - 3 µg/l (Honkanen y col., 1995; Lacroix, 1995; Gardner y col., 1995; Sischo, 1996; Zaadhof y col., 1997; IDF-FIL, 2010) y resulta cercano a las 4 µg/l determinadas para el Bioensayo GT, aunque Smink (1979) obtiene un valor superior (6 µg/l) para residuos de penicilina analizados por Delvotest<sup>®</sup> SP.

Respecto a las cefalosporinas, Nagel (2009) al utilizar un bioensayo con *G. stearothermophilus* obtiene límites de detección muy próximos a los establecidos en la Tabla 35 para cefalexina (159 µg/l), cefadroxil (99 µg/l), cefoperazone (62 µg/l), ceftiofur (105 µg/l) y cefuroxime (52 µg/l).

Para otros métodos de inhibición microbiológica tales como BRT<sup>®</sup> AiM, Charm y Ruth (1993) obtienen límites de detección de ceftiofur en un rango de 105 - 119 µg/l, aunque Zorraquino (1997, 1998) obtiene valores más elevados (150 a 200 µg/l) para este método. Al emplear el método Delvotest<sup>®</sup> SP para detectar residuos de ceftiofur en leche de vaca, Honkanen y col., (1995), Lacroix (1995), Gardner y col., (1995), Sischo (1996) y IDF-FIL (2010) indican niveles más bajos (50 µg/l) al calculado para el Bioensayo GT.

El LD del Bioensayo GT para cefoperazone en leche (240 µg/l) resulta muy superior a las 80 µg/l señaladas por Jaskch (1988) y los 25-50 µg/l publicadas por la

IDF-FIL (2010) para el método BRT<sup>®</sup> AiM, sin embargo, Zorraquino (1997, 1998) obtiene un valor inferior (42 µg/l) para este método.

Según el boletín de la Federación Internacional del Lechería (IDF-FIL, 2010), los métodos microbiológicos comerciales Delvotest<sup>®</sup> SP y BRT<sup>®</sup> AiM detectan concentraciones de cefalexina en leche (50-100 y 200-300, respectivamente) inferiores a los del bioensayo GT (480 µg/l). En lo que respecta a límites de detección de cefadroxil se debe destacar que no se han encontrado valores de referencia en la bibliografía consultada.

*IV.2.3.2.2 Aminoglucósidos:* las ecuaciones que expresan las curvas dosis-respuestas obtenidas mediante la aplicación del modelo de regresión logístico a las calificaciones visuales del bioensayo se visualizan en (Tabla 36).

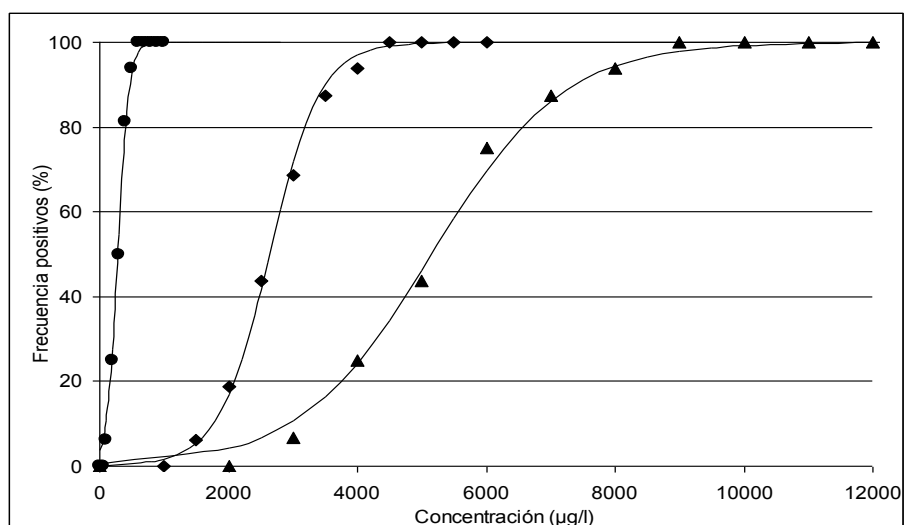
Los ajustes obtenidos mediante el modelo logístico fueron altos para todos los aminoglucósidos estudiados, puesto que los coeficientes de concordancia se hallan comprendidos en el rango 86,6% (Neomicina) y 91,1% (Estreptomina). Para visualizar los efectos que produce el incremento de las concentraciones de los antimicrobianos sobre las frecuencias de respuestas positivas al Bioensayo GT, se construyó la Figura 15.

**Tabla 36:** Coeficientes del modelo de regresión logística para las curvas dosis respuestas del Bioensayo GT analizado con aminoglucósidos en leche

Aminoglucósidos	Logit [P] = $\beta_0 + \beta_1$ [AMG]	C
Kanamicina	Logit [P] = -5,1011 + 0,0010 [KAN]	88,3
Neomicina	Logit [P] = -3,2765 + 0,0115 [NEO]	86,6
Estreptomina	Logit [P] = -6,6734 + 0,0025 [STM]	91,1

AMG: Aminoglucósido, KAN: kanamicina, NEO: neomicina, STM: estreptomina, C: Concordancia porcentual.

De los aminoglucósidos estudiados, neomicina presenta una pendiente más pronunciada de la curva dosis respuesta debido a su elevado coeficiente “B<sub>1</sub>” (0,0115), lo que evidencia una mayor sensibilidad con respecto a las demás moléculas del grupo.



**Figura 15.** Curvas dosis respuestas de aminoglucósidos en leche analizadas por el Bioensayo GT (▲: kanamicina, ●: neomicina, ◆: estreptomicina).

Los límites de detección de aminoglucósidos se resumen en la Tabla 37 y fueron calculados utilizando las ecuaciones logísticas de Tabla 36. Se deduce que solamente neomicina puede ser detectada a niveles inferiores a su LMR (1500 µg/l).

**Tabla 37.** Límites de detección de aminoglucósidos en leche mediante el bioensayo GT

Antimicrobianos	LD	LMR
Kanamicina	8130	150
Neomicina	540	1500
Estreptomicina	3800	200

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

Para un bioensayo con *G. stearothermophilus*, Nagel (2009) calcula mediante el modelo logístico, LDs similares para neomicina (600 µg/l) e inferiores para kanamicina (5600 µg/l) y estreptomicina (2300 µg/l) a las expuestas en la (Tabla 37).

El límite de detección de 540 µg/l de neomicina determinado en este bioensayo GT resulta similar a los 500-750 µg/l reportados por IDF- FIL (2010) y 500 µg/l Charm y Ruth (1993) cuando emplea el BRT<sup>®</sup> AiM.

Los residuos de estreptomicina deben hallarse en la leche a una concentración superior a 20 veces su LMR (200 µg/l) para poder ser detectados mediante este método. De esta forma, el límite de detección (3800 µg/l) en leche se halla dentro del rango 1500-5000 µg/l publicado por Frank (1995) y resultó superior a 1000-2000 µg/l

establecido por la casa fabricante BRT<sup>®</sup> AiM (Analytic in Milch, 1998; IDF-FIL-, 2010).

Cuando se evalúan límites de detección de métodos microbiológicos en otras matrices, Molina y col., (2003) obtienen LDs más elevados cuando utilizan el método BRT<sup>®</sup> AiM con muestras de leche de oveja (6000 µg/l de estreptomicina, 1200 µg/l de gentamicina y 3700 µg/l de neomicina). De igual forma, Althaus y col., (2002) detectan 10000 µg/l de estreptomicina, 1200 µg/l de gentamicina y 3300 µg/l de neomicina con el método Delvotest<sup>®</sup> SP. Por su parte, Montero y col. (2005) al emplear el método Eclipse<sup>®</sup> 100ov detectan niveles elevados de gentamicina (3140 µg/l), kanamicina (18700 µg/l), neomicina (9100 µg/l) y estreptomicina (10100 µg/l) en leche de oveja.

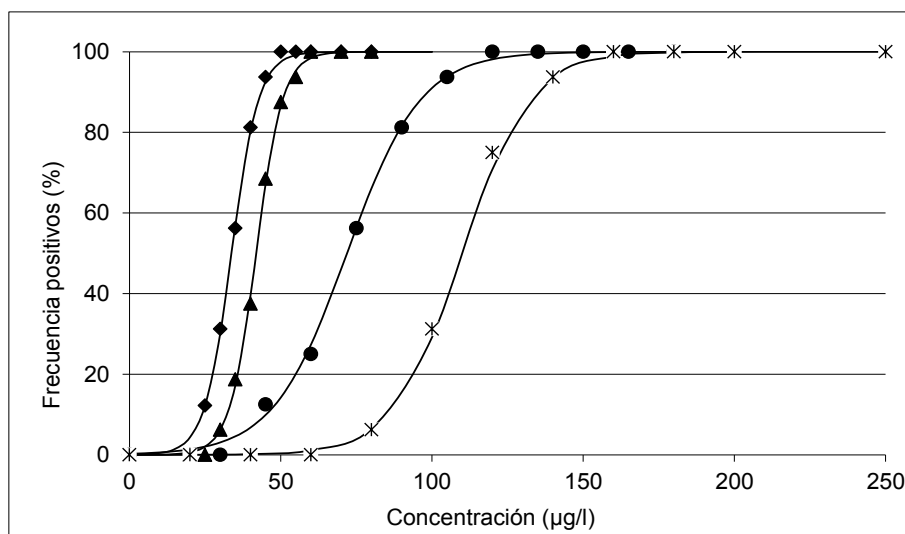
El boletín de la Federación Internacional de Lechería (IDF-FIL, 2010) publica un LD de 300-2000 µg/l de neomicina, 1500-10000 µg/l de estreptomicina y 7500 µg/l de kanamicina para muestras de leche analizadas por el método Delvotest SP, valores similares a los detallados en la (Tabla 37).

*IV.2.3.2.3 Macrólidos:* las ecuaciones de regresión logística que predicen la respuesta del bioensayo (Tabla 38), las curvas dosis respuestas (Figura 16) y los límites de detección del bioensayo para los diferentes macrólidos analizados (tabla 39), se exponen a continuación:

**Tabla 38.** Coeficientes del modelo de regresión logística para las curvas dosis respuestas del Bioensayo GT analizado con macrólidos en leche

Macrólidos	Logit [P] = $\beta_0 + \beta_1$ [MCL]	C
Eritromicina	Logit [P]= -9,7711 + 0,0888 [ERI]	88,1
Lincomicina	Logit [P]= -5,9103 + 0,0822 [LIN]	88,0
Tilmicosina	Logit [P]= -7,5722 + 0,2244 [TILCO]	89,7
Tilosina	Logit [P]= -9,5616 + 0,2284 [TIL]	90,5

MCL: Macrólido, ERI: eritromicina, LIN: lincomicina, TILCO: Tilcomisina, TIL: tilosina, C: Concordancia porcentual (%).



**Figura 16.** Curvas dosis respuestas de macrólidos en leche analizados por el Bioensayo GT. (▲: tilosina, ◆: Tilmicosina, X: eritromicina, ●: lincomicina)

El bioensayo GT presenta pendientes más pronunciadas (altos coeficientes “B<sub>1</sub>”) para tilosina y tilmicosina, lo cual se verá reflejado en una mayor sensibilidad y bajos límites de detección. Todas las ecuaciones logísticas presentan adecuados coeficientes de concordancia, lo que denota un buen ajuste del modelo sobre las calificaciones visuales del bioensayo GT.

En Figura 16, se aprecia un rápido incremento de los resultados positivos al método (debido a altos coeficientes” B<sub>1</sub>”) a medida que se aumentan las concentraciones de tilmicosina y tilosina en leche. Además, una concentración de estos antibióticos en leche que presente una concentración de 50 µg/l produce el 100 % de frecuencias de resultados positivos al método. Por el contrario, eritromicina y lincomicina presentan curvas dosis respuesta con pendientes más suavizadas por tener bajos valores de coeficientes “B<sub>1</sub>”.

**Tabla 39.** Límites de detección de macrólidos en leche mediante el bioensayo GT.

Antimicrobianos	LD	LMR
Eritromicina	140	40
Lincomicina	110	150
Tilmicosina	47	50
Tilosina	55	50

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

Según la Tabla 39, bajos niveles en las concentraciones de tilosina (55 µg/l), tilmicosina (47 µg/l) y lincomicina (110 µg/l) resultan suficientes para conservar la coloración del bioensayo (resultado positivo). Por el contrario, eritromicina requerirá de mayores concentraciones (200 µg/l), para producir un 100% de resultados positivos, debido a los bajos valores de los coeficientes “β<sub>1</sub>” (Tabla 39). A modo de resumen, este bioensayo permite detectar residuos de tilosina, tilmicosina y lincomicina en leche a niveles cercanos a sus respectivos LMRs (50 µg/l, 50 µg/l y 150 µg/l, respectivamente).

Los niveles de detección para los residuos de tilosina fueron próximos a los 50-100 µg/l (Frank, 1995), 58-68 µg/l (Zorraquino, 1997, 1998) y 25-50 µg/l (IDF-FIL, 2010) determinados para el método BRT<sup>®</sup> AiM. En cambio, el límite de detección de eritromicina en leche (140 µg/l) fue superior a los 40-60 µg/l publicados por IDF-FIL (2010) e inferior a los 2250 µg/l, 2500 µg/l calculadas por Heeschen (1993) y Heeschen y Blüthgen (1995), respectivamente. Por su parte, los niveles de detección de tilmicosina (55 µg/l) con bioensayo GT son inferiores a los 100 µg/l reportados en IDF-FIL (2010) cuando se utiliza método Delvotest SP.

IV.2.3.2.4 *Quinolonas*: los modelos logísticos (Tabla 40), las curvas dosis respuestas (Figura 17) y los límites de detección de las quinolonas ensayadas, en la (Tabla 41) se presentan a continuación:

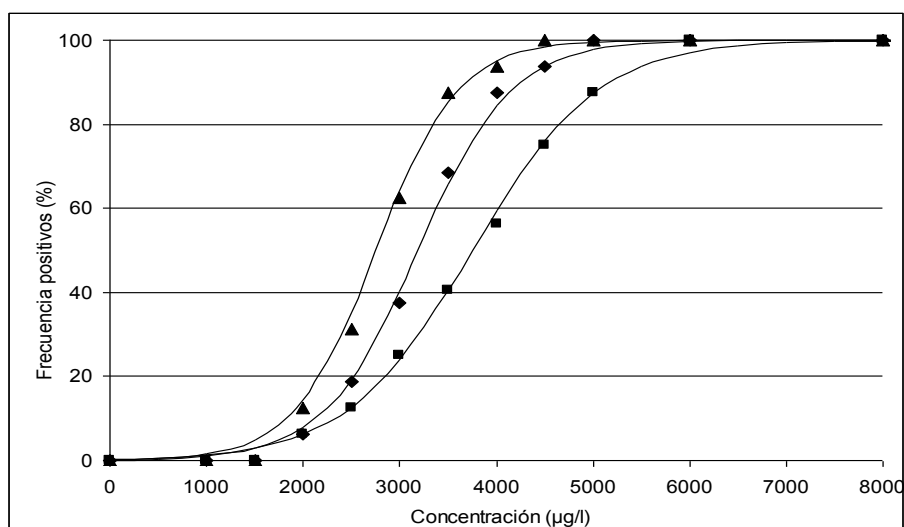
**Tabla 40** Coeficientes del modelo de regresión logística para las curvas dosis respuestas del Bioensayo GT ensayados con quinolonas en leche

<i>Quinolonas</i>	Logit [P] = β <sub>0</sub> + β <sub>1</sub> [QNL]	C
Ciprofloxacina	Logit [P]= -5,8202 + 0,0015 [CIPRO]	85,4
Enrofloxacina	Logit [P]= -6,63919 + 0,0028 [ENRO]	81,1
Marbofloxacina	Logit [P]= -6,5240 + 0,0024 [NOR]	82,0

QNL: Quinolona, CIPRO: Ciprofloxacina, ENRO: Enrofloxacina, MARBO: Marbofloxacina, C: Concordancia porcentual.

Los coeficientes B1 de las ecuaciones de regresión logística (Tabla 40) son altos (81,1% para enrofloxacina – 85,4 para ciprofloxacina) para todas las quinolonas analizadas, lo que demuestra un buen ajuste del modelo de regresión propuesto. Por su parte, las pendientes de las quinolonas (coeficiente “B<sub>1</sub>”) son bajas comparadas con las de las penicilinas Tabla 34, lo cual nos indica que la sensibilidad del *G. thermoleovorans* para detectar estas sustancias es muy baja.





**Figura 17.** Curvas dosis respuestas de quinolonas en leche analizadas por el Bioensayo GT (♦: enrofloxacina, ■: ciprofloxacina, ▲: marbofloxacina).

Las curvas dosis respuestas (Figura 17) reflejan un suave incremento de los resultados positivos del método conforme aumenta la concentración de antibiótico (bajos valores “B<sub>1</sub>”). Además, se observa que es necesario concentraciones superiores a 6000 µg/l de quinolonas en leche para producir el 100% de resultados positivos al método.

**Tabla 41** Límites de detección de quinolonas en leche mediante el bioensayo GT

Antimicrobianos	LD	LMR
Ciprofloxacina	5650	100
Enrofloxacina	4600	100
Marbofloxacina	4000	75

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

Los límites de detección son muy elevados en comparación con sus LMRs (más de 40 veces superior), no siendo detectados por *G. thermoleovorans*. De esta forma, algunos autores (Foselie y Maris, 1999; Gaudin y col., 2001, Nouws y col., 1998) proponen el uso de *Escherichia coli* ATCC 11303 para analizar residuos de quinolonas, ya que este microorganismo posee muy buena sensibilidad, llegando a detectar 5 µg/l de enrofloxacina y 8 µg/l de marbofloxacina.

Cuando se utilizan otros métodos de screening para la detección de quinolonas, Müller y Jones (1993) también calculan un LD elevado (desde 1000 hasta 2250 µg/l) para residuos de enrofloxacina en leche cuando emplean el método BRT<sup>®</sup> AiM. En

leche de oveja, Montero y col., (2005) utilizan altas concentraciones de ciprofloxacina (5100 µg/l), enrofloxacina (4000 µg/l), flumequine (76200 µg/l) y norfloxacina (9500 µg/l) para ser detectadas por el método Eclipse® 100 ov. En forma similar, Linage y col., (2007) detectan 41000-46000 µg/l de enrofloxacina en leche de oveja con el método B-Y- Test Charm®.

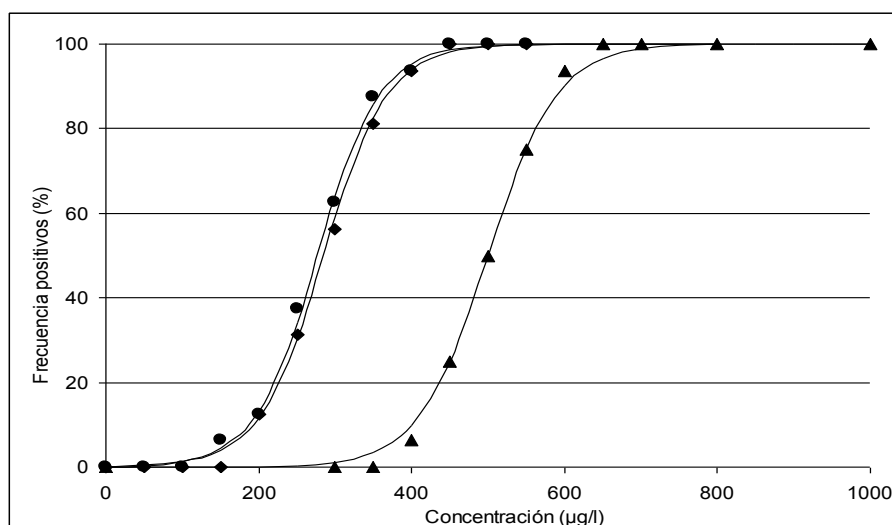
*IV. 2.3.2.5 Tetraciclinas:* En Tabla 42 se exponen las ecuaciones que predicen las frecuencias de resultados positivos al bioensayo en función de la concentración de tetraciclinas en leche. Los valores de las pendientes de tetraciclina ( $B_1=0,0243$ ) y oxitetraciclina ( $B_1=0,0243$ ) son similares entre sí, poniendo de manifiesto una sensibilidad equivalente, a diferencia de clortetraciclina que posee un parámetro levemente inferior ( $B_1=0,0222$ ). Los coeficientes de concordancia fueron adecuados y se ubicaron entre 85,6% para oxitetraciclina y 90,1% para clortetraciclina.

**Tabla 42.** Coeficientes del modelo de regresión logística para las curvas dosis respuestas del Bioensayo GT analizado con tetraciclinas en leche

Tetraciclina	Logit [P] = $\beta_0 + \beta_1$ [TCs]	C
Clortetraciclina	Logit [P] = $-11,1166 + 0,0222$ [CTC]	90,1
Oxitetraciclina	Logit [P] = $-6,7332 + 0,0243$ [OTC]	85,6
Tetraciclina	Logit [P] = $-6,7886 + 0,0238$ [TC]	85,8

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

La figura 18 visualiza el efecto de las concentraciones de TCs presentes en las muestras de leche sobre las frecuencias relativas de resultados positivos al Bioensayo GT. Concentraciones de 400 µg/l de OTC (oxitetraciclina) y TC (tetraciclina) producen un 100% de resultados positivos, mientras que CTC (clortetraciclina) debe estar presente a concentraciones más elevadas (700 µg/l).



**Figura 18.** Curvas dosis respuestas de tetraciclinas en leche analizadas por el Bioensayo GT (▲: clortetraciclina, ●: oxitetraciclina, ◆: tetraciclina).

Los LDs calculados mediante las ecuaciones logísticas (Tabla 21 y Tabla 35) se muestran en la (Tabla 43) Se observa que el valor de límites de detección de clortetraciclina (630 µg/l) es más elevado que el resto de las tetraciclinas analizadas ( $LD_{OTC} = 400 \mu\text{g/l}$  y  $LD_{TC} = 410 \mu\text{g/l}$ ). Este hecho obedece a su menor valor del coeficiente “ $\beta_1$ ” (0.0222) en comparación con las otras moléculas del mismo grupo (Tabla 21).

**Tabla 43** Límites de detección de antibióticos tetraciclinas en leche mediante el Bioensayo GT

Tetraciclina	LD	LMR
Clortetraciclina	630	100
Oxitetraciclina	400	100
Tetraciclina	410	100

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

Cuando se consideran otros test de inhibición microbiológica que utilizan *G. stearothermophilus* y un indicador ácido base (púrpura de bromocresol), se observa que Delvotest® “SP” presenta límites de detección de 500 µg/l para OTC (Luitz y Suhren, 1995 a y b; IDF-FIL, 2010) y 600 µg/l (Senyk y col., 1990; IDF-FIL, 2010) para TC en leche, que resultan superiores a los obtenidos en este trabajo. Según el boletín de la IDF-FIL (2010) el método Eclipse®100 permite detectar residuos de OTC y TC

cercanos sus LMRs (100 µg/l), a diferencia de los reportados para este bioensayo. Al respecto, se debe destacar que métodos de inhibición que utilizan medio de cultivo Müller Hinton e indicador de óxido-reducción negro brillante también presentan altos niveles de detección para las TCs, como por ejemplo el método BRT<sup>®</sup> AiM que divisa 500-750 µg/l de OTC (IDF-FIL, 2010) o 1500-5000 µg/l de TC (Frank, 1995). De igual forma, Molina y col., (2003) detectan valores elevados (5500 µg/l de OTC y 6200 µg/l de TC) para el método BRT<sup>®</sup> AiM con muestras de leche de oveja.

*IV.2.3.2.6 Sulfamidas:* En este apartado se estudiaron concentraciones de sulfadimetoxina, sulfametazina, sulfonilamida y sulfatiazol (100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800, 2000 mg/l) en leche y no se registraron resultados positivos al método, demostrando que un bioensayo en placas de microtitulación con *G. thermoleovorans* no presenta sensibilidad para la detección de estas sustancias. Del mismo modo que en el formato de placas de Petri, se sugiere llevar a cabo un estudio posterior que evalúe el posible efecto sinérgico de las sulfamidas con trimetropim a fin de lograr la detección de sulfamidas en leche a niveles similares a los permitidos por la legislación.

## V. CONCLUSIÓN.

De los resultados de este trabajo se deducen una serie de conclusiones respecto al diseño y evaluación de un bioensayo de inhibición microbiológica que emplea *Geobacillus thermoleovorans* como bacteria test:

### **Estudio I: Determinación de los Límites de detección y las CIM de un bioensayo en placas de Petri que utiliza *G. thermoleovorans*:**

\_ El método de inhibición microbiológica de difusión radial muestra que el *G. thermoleovorans* presenta límites de detección cercanos a las CIMs para cefalexinas (cefalexina y ceftiofur), macrólidos (tilmicosina, tilosina), lincomicina, neomicina y oxitetraciclina. Por el contrario, los valores de límites de detección para las penicilinas, quinolonas y sulfamidas son elevados, lo que denota una escasa sensibilidad de la bacteria test para la detección de estos grupos de antimicrobianos.

### **Estudio II: Elaboración de un bioensayo en placas de titulación con *G. thermoleovorans***

\_ El incremento en la concentración de esporas de la bacteria test en el medio de cultivo constituido (Mueller Hinton 38 g/l, pH=8,5, D-glucosa 10 g/l, mezcla de indicadores 10 mg/l azul de toluidina – 200 negro brillante mg/l) disminuye el tiempo de respuesta del método. Se recomienda una concentración aproximada de  $1,5 \times 10^9$  esp *G. thermoleovorans*/ml (1 hora 30 minutos).

\_ La incorporación de 6 mg/l de ácido clavulánico en el medio de cultivo del bioensayo mantiene elevados valores de especificidad (99%) y permite disminuir significativamente los límites de detección de penicilina (17 vs. 4 µg/l), amoxicilina (18 vs. 3 µg/l), ampicilina (17 vs. 5 µg/l), cloxacilina (320 vs. 80 µg/l) y oxacilina (315 vs. 30 µg/l) en leche, hasta valores similares a sus Límites Máximos de Residuos.

\_ Un bioensayo que contiene  $1,5 \times 10^9$  esp/ml de *G. thermoleovorans* presenta un tiempo de incubación inferior (1,5h) a los actuales métodos comerciales (Delvotest<sup>®</sup>, Eclipse<sup>®</sup>, Charm BY<sup>®</sup>) y posee LD cercanos a LMR para detectar residuos de penicilinas (3 µg/l de amoxicilina, 4 µg/l de ampicilina, 80 µg/l de cloxacilina, 34 µg/l de oxacilina y 4

μg/l de penicilina), cefalosporinas (140 μg/l de ceftiofur), macrolidos (110 μg/l de lincomicina, 47 μg/l de tilmicosina y 55 μg/l de tilosina) y neomicina (540 μg/l), no presentando adecuada sensibilidad para tetraciclinas, sulfamidas y quinolonas en leche.

Con el propósito de lograr una detección de residuos de antibióticos en leche más eficiente, en un futuro, resultaría interesante llevar a cabo nuevos bioensayos que utilicen otros microorganismos de prueba tales como *Geobacillus kaustohpilus* o *G. thermocatenulatus*. De esta manera se pretende desarrollar un bioensayo o sistemas de bioensayos, de fácil empleo, rápidos, económicos y que permitan detectar un elevado número de residuos de antibióticos en la leche y colaborar con uno de los principios de la Seguridad Alimentaria que es la protección del consumidor.

## VI BIBLIOGRAFÍA.

1. Abriouel, H.; Ben Omar, N.; Lucas López, R.; Gálvez, A. 2008. La doble faceta del género *Enterococcus*, y su importancia en alimentos. *Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental*. 21(1): 154-168.
2. Acar, J.F y Goldstein, F.W. (1997). Trends in bacterial resistance to fluoroquinolones. *Clinical Infectious Diseases*, 24 (1): S67-S73
3. Adams H. R. 2003. Quimioterapia en las enfermedades microbianas. En *Farmacología y terapéutica veterinaria*. Ed. Acribia. Zaragoza (España): 835-981.
4. Althaus, R.; Peris, C.; Montero, A.; Torres, A.; Molina, M. P.; Fernandez, N. 2002. Detection limits of antimicrobial agents in ewe milk by Delvotest<sup>®</sup>. *Milchwissenschaft*. 57: 660-664.
5. Althaus, R.; Berruga, M.; Montero, A.; Roca, M. y Molina, M. (2009). Evaluation of a Microbiological Multi-Residue System on the detection of antibacterial substances in ewe Milk. *Analytica Chimica Acta*, 632: 156-162
6. Aiello, S. E. 1998. *Veterinary Merck Index*, Merck, Washington DC, USA:pp.1779.
7. Al-Ahmad, A., Daschner, F. D., Kümmerer, K. (1999). Biodegradability of cefotiam, ciprofloxacin, meropenem, penicillin G, sulfamethoxazole inhibition of waste water bacteria. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 37, 158-163.
8. Alder, A. C., McArdell, C. S., Golet, E. M., Ibric, S., Molnar, E., Nipales, N. S., Gieger, W. (2001). Occurrence fate of fluoroquinolone, macrolide, sulfonamide antibiotics during wastewater treatment in ambient waters in Switzerl. In C. G. Daughton T. Jones-Lepp. *Pharmaceuticals Personal Care Products in the Environment. Scientific Regulatory Issues*, pp. 56-69. American Chemical Society, Washington, D.C.
9. Alós Cortés, J. A.; Arias Silgo, F.; Egocheaga Cabello, I.; Gómez Garcés, J. L.; López Madroñero, C.; Marmesat Guerrero, F.; Oteo Iglesias, J.; Pérez Gómez, A.; Ripoll Lozano, M. A. 2004. Telitromicina: un nuevo antibiótico. *Revista de SEMG*. 60: 33-38.
10. Barnas, G.; Nimphius, N. 1996. *Antibiotic Guide*. Wiscosin, Medical College. Disponible en:<http://www.interned...g/antibiotics.html>, 10 de diciembre de 2010.
11. Berruga, M. I.; Molina, M. P.; Noves, B.; Roman, M. and Molina, A. 2007. In Vitro study about the effect of several penicillins during the fermentation of yogurt made from ewe's milk. *Milchwissenschaft*. 62: 303-305.

12. Bishop, J.; White, C. 1984. Antibiotic residue detection in milk. A review. *J. Food Prot.* 47: 647-652.
13. Bonato, P.; Spoloar, D. 1994. Le Sostanze Ininentinei Prodotti di Latte. *Microbiología Lattiero Casearia*. Ed. Clesav. Milano. Pp 422-431
14. Borcharding, S. M.; Stevens, R.; Nicholas, R. A.; Corley, C. R.; Self, T. 1996. Quinolones: a practical review of clinical uses, dosing considerations, and drug interactions. *J. Farm. Pract.* 42: 69-78.
15. Botsoglou, N. and Fletouris, J. 2001. Drugs residues in foods: Pharmacology, food safety, and analysis. En: *Serie Food Science and technology*. ed. Marcel Dekker, Inc. New York, USA.
16. Bozdogan, B.; Berrezouga, L.; Kuo, M.; Yurek, D.; Farley, K.; Stockman, B.; Leclercq, R. 1999. A New Resistance Gene, *lin B*, Conferring Resistance to Lincosamides by Nucleotidylation in *Enterococcus faecium* HM1025. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. p. 925–929.
17. Brady, M. S. y Katz, S.E. 1987. Antibiotic/antimicrobial residues in milk. *Journal of food protection*, 51(1): 8-11.
18. Brighty, K. E.; Gootz, T. D. 1997. The chemistry and biological profile of trovafloxacin. *J. Antimicrob. Chemother.* 39 (B):1-14.
19. Brouillet, P. 1994. Maitrise de la présense d´inhiteurs dans le lait. *Recl. Méd. Vét. Ec. Alfort.* 170 (6/7): 443-455.
20. Brugueras, M.; Morejón García, M. 1998. Antibacterianos de Acción Sistémica. Parte II. Otros Grupos de Antibióticos. *Rev Cubana Med Gen Integr*; 14(4):362-73.
21. Brunner, H.; Zeiler, H. J. 1988. Oral ciprofloxacin treatment for *Salmonella typhimurium* infection of normal and immunocompromised mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32: 57–62.
22. Bryskier, A.; Agouridas, C.; Chantot, J.F. 1993. Structure and activity. In: Neu HC, Young LS, Zinner SH (eds): *The new macrolides, azalides and streptogramins, pharmacology and clinicals applications*, Editorial Marcel Dekker, New York, USA, pp.: 3-8.
23. 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.



24. 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.
25. CAA (Código Alimentario Argentino). 2001. Capítulo VIII: Alimentos Lácteos (artículos artículos 555, 556, 556 bis). Decreto 2126/71 del Código Alimentario Argentino
26. Cancho Grande, B.; García Falcón, M. S y Simal Gandara, J. 2000. The use of antibiotics in animal feeds: an actual perspective. *Ciencia y Tecnología de los Alimentos*, 3 (1): 39-47.
27. Calderón, A.; García, F. y Martínez, G. 2006. Indicadores de calidad de leches crudas en diferentes regiones de Colombia. *Revista de Medicina Veterinaria y Zootecnia de Córdoba*, 11 (1): 725-737.
28. CEE (Comunidad Económica Europea). 1990. Decisión No. 2377/90. Procedimiento para establecer los límites máximos de residuos de productos medicinales veterinarios en alimentos de origen animal. 26 de junio de 1990. *Diario Oficial de la Comunidad Europea (DOCE) N° L224:1-8*.
29. CEE (Comunidad Económica Europea). 1992A. Decisión No. 675/92. Anexos I y III de la CEE (Comunidad Económica Europea). Decisión No. 2377/90: Procedimiento para establecer los límites máximos de residuos de productos medicinales veterinarios en alimentos de origen animal. 18 de Marzo 1992. *Diario Oficial de la Comunidad Europea (DOCE) N° L73: 8-14*.
30. CEE (Comunidad Económica Europea). 1992B. Decisión No. 3093/92. Anexo III de la CEE (Comunidad Económica Europea). Decisión No. 2377/90: Procedimiento para establecer los límites máximos de residuos de productos medicinales veterinarios en alimentos de origen animal. 27 de octubre 1992. *Diario Oficial de la Comunidad Europea (DOCE) N° L311: 18-19*.
31. CEE (Comunidad Económica Europea). 1993. *Diario Oficial de la Comunidad Europea (DOCE)*. Directiva 93/257/CEE del Consejo del 15 de abril de 1993, L118: 75-79.
32. CEE (Comunidad Económica Europea). 1996. Decisión No. 3093/92. Anexo III de la CEE (Comunidad Económica Europea). Decisión No. 2377/90: Procedimiento para establecer los límites máximos de residuos de productos medicinales veterinarios en

alimentos de origen animal. 27 de abril 1996. Diario Oficial de la Comunidad Europea (DOCE) N° L125: 10-32.

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

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

**35.** Charm, S. E., & Ruth, G. P. 1993. Advances in Charm technology for antimicrobial residues in milk. *Bulletin-FIL-IDF (Belgium)*.

**36.** Charlón M, Taverna, E Walter, F Manzi 2004. EEA Rafaela INTA, Riego por aspersión un posible destino de los efluentes del tambo.

**37.** Chander Y., Kumar K., Goyal S. M., Gupta S. C. 2005. Antibacterial activity of soil-bound antibiotics. *J. Environ. Qual.* 34: 1952-1957.

**38.** Cinquina A. L., 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.

**39.** CODEX ALIMENTARIUS, 1996. Residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos. Henzenn, Hilda Inés - 2013 - Bibliografía 116 53.

**40.** 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.

**41.** Colinas, C., Ingham, E., Molina, R. 1994. Population responses of target non-target forest soil-organisms to selected biocides. *Soil Biol. Biochem.* 26, 41-47.

**42.** Cordiés Jackson, L.; Machado Reyes, L.; Hamilton Cordiés, M. 1998. Principios Generales de la Terapéutica Antimicrobiana. *ACTA MÉDICA*; 8(1):13-27

**43.** Currie, D.; Lynas. L.; Kennedy. G.; Mc Caughey. J.; 1998. "Evaluation of modified EC four plate method to detect antimicrobial drugs". *Food Addit. Contam.*, 15: 651-660.

44. Dana, E.; King, M. D.; Malone, R.; Lilley, S. 2000. New Classification and Update on the Quinolone Antibiotics: Review - East Carolina University School of Medicine, Greenville, North Carolina, USA.
45. Debackere, M. 1995. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antimicrobial in relation to their residues in milk. ProceedingSymposiun Residues of Antimicrobial Drugs and other inhibitors in milk. Kiel. August. 28-31.
46. Del Prato, 1997, Gli Inibenti Nel Latte ei Loro Effetti Sulle Trasformazioni Casearie22(7): 40-48
47. Demoly, P.; Romano, A. 2005. Update on Beta-lactam allergy diagnosis. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 1: 9-14.
48. Devriese, L. A. 1980. Two new types of resistance to lincomycin in pathogenic staphylococci from animals. *Ann. Inst. Pasteur (Paris) France*, 131B: 261–266.
49. Dewdney, J. M.; Maes. L., Raynaud J.P., Blanc, F., Scheid J. P., Jackson T., Lens, S., Verschueren, C.,1991. “Risk assessment of antibiotic residues of beta-lactams and macrolides in food-products with regard to their immunoallergic potential”. *Food and chemical Toxicology*, 29: 477-483.
50. 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.
51. Dutta, G. N.; Devriese, L. A. 1981. Degradation of macrolide-lincosamide-streptogramin antibiotics by *Lactobacillus* strains from animals. *Ann.Inst. Pasteur. Paris.* 132A: 51–57
52. Edder, P.; Coppex, L.; Cominoli, A.; Corvi, C. 2002. Analysis of erythromycin and oleandomycin residues in food by high-performance liquid chromatography with fluorometric detection- *Food Additives and Contaminants-* ISSN 0265-203X.
53. Epstein, M.; Amodio-Groton, M.; Sadick, N. 1997. Antimicrobial Agents for the Dermatologist. II. Macrolides, Fluroquinolones, Rifamiciycins, Tetracyclines, Trimethoprim-Sulfamethoxazole, and Clindamycin. *J. Am. Acad. Dermatol.* 37: 365-381.

- 54.** FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura).2010/2012<http://faostat.fao.org/DesktopDefault.aspx?pageid=339&country=9&lang=es>.
- 55.** FEDESA. 1999. Una perspectiva sobre antibióticos, salud animal y el debate sobre la resistencia Antibióticos para Animales, disponible en: <http://www.veterindustria.com/modules/interes/files/dossier1.pdf> . 21 de diciembre de 2010. pp.: 21.
- 56.** Feng L., Guang-Guo Y., Ran T., Jian-Liang Z., Ji-Feng Y., Lan-Feng Z., Effects of six selected antibiotics on plant growth and soil microbial and enzymatic activities, *Env. Pollution*, 2009, 157: 1636–1642.
- 57.** Fernandes, P. B.; Chu, D. T. W.1988. [Design, synthesis, and properties of \(4S\)-7-\(4-amino-2-substituted-pyrrolidin-1-yl\) quinolone-3-carboxylic acids](#). *Annu. Rep. Med. Chem.*23: 133-138.
- 58.** Fitton, A. 1992. The quinolones. An overview of their pharmacology. *Clin. Pharmacokinet.* 22 (1): 1-11.
- 59.** Forth W., Henschler D., Rummel W., Starke K. 1992. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, 6th ed. Wissenschaftsverlag Mannheim, Zurich, Germany.
- 60.** Fuselier, R. y Maris; Cadieu, N.; Maris, P. 1999. Results of a proficiency testing for the analysis of carbadox and olaquinox residues in pig tissue. A.F.S.S.A. Community Reference Laboratory for Residues of Veterinary Drugs BP 90203 - 35302 FOUGERES Cedex – Francia.
- 61.** Frank, S. 1995. Bestimmung der Nachweisgrenzen ausgewählter Antibiotika und Sulfonamide im Brillantschwarz-Reduktionstest. Diss. Universität Diplomarbeit Thier. Triesdorf, Germany. 70 pp.
- 62.** Gale, E. F.; Cundliffe, E.; Reynolds, P. E.; Richmond, M. H.; Waring, M. J. 1981. *The Molecular Basis of Antibiotic Action*. Ed. John Wiley and Sons. Academic Press. New York. USA. p 478-480.
- 63.** Gardner, I.; Cullor, J.; Galey, F.; Sischo, W.; Salman M.; Slenning, H.; Tyler, J. 1995. Alternatives for validation of diagnostic assays used to detect antibiotic residues in milk. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 209: 46-52

- 64.** Garey, K. W.; Amsden, G. W. 1999. Trovafloxacin: an overview. *Pharmacotherapy*.19: 21-34.
- 65.** Gaudin, V.; Fontaine, J.; Maris, P. 2001. Screening of penicillin residues in milk by a surface plasmon resonance-based biosensor assay: comparison of chemical and enzymatic sample pre-treatment. *Analytica Chimica Acta*, 436:191-198.
- 66.** Gilbert, D.N. 2000. Aminoglycosides. En: Mandell, G.L.; Bennett, J.E.; Dolin, R. Editors: Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone. 307-336.
- 67.** Gonzalez- Villa, M., Ribas-Aparicio, R. M., Coria-Jiménez, R., Donis-Rocandio, J.E., & Aparicio-Ozores, G. 2012. Detección de la  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido OXA-141 en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de pacientes con fibrosis quística. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 30(9), 535-541.
- 68.** Goodman, L.; Gilman, A. 1990. Farmacología y terapéutica veterinaria, volumen II. Cap. 51; 77 p. Ed. Acribia.
- 69.** Goursand, 1991; Composición y propiedades fisico-químicas en Leche y productos lácteos: vaca-oveja-cabra. 1-92 p. Ed. Acribia. S.A. Zaragoza.
- 70.** García Arancibia R., Depetris Guiguet E., Vicentin Masaro J. y G. Rossini. 2013. "Factores Determinantes de la Oferta Exportadora Láctea Santafesina". Documento de Trabajo No. 4, IECAL, FCE, UNL.
- 71.** Gyrd-Hansen, N.; Rasmussen, F.; Smith, M. 1981. Cardiovascular effects of intravenous administration of tetracycline in cattle. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 4 (1): 15-25.
- 72.** Halling-Sorensen, B., Sengelov, G., Ingerslev, F., Jensen, L. B. 2003. Reduced antimicrobial potencies of oxytetracycline, tylosin, sulfadiazin, streptomycin, ciprofloxacin, olaquinox due to environmental processes. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 44, 7-Hamscher G., Sczesny, S., Höper, H., Nau, H. 2002. Determination of Persistent Tetracycline Residues in Soil Fertilized with Liquid Manure by High-Performance Liquid
- 73.** 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.

- 74.** Heeschen, W.; Suhren, G. 1995. IDF integrated detection system for antimicrobials: Introductory statement and practical experiences in Germany. 310-318. *In* Residues of Antimicrobial Drugs and Other inhibitors in Milk. IDF S. I. N° 9505. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica.
- 75.** Heeschen, W.; Blüthgen, A. 1995. Veterinary drugs and pharmacologically active compounds. En: Residues and contaminants in milk products. IDF S. I. N° 9101. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica. 16-39.
- 76.** Honkanen-Buzalski, T.; Reybroeck, W. 1996. Antimicrobials. En: Residues and contaminants in milk and milk products. IDF S.I. n° 9701. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica.p: 26-34.
- 77.** Horie, M. 1995. Chemical analysis of macrolide antibiotics. Chemical Analysis for Antibiotics Used in Agriculture. AOAC International. Arlington. USA. p. 165-205.
- 78.** IDF-FIL (International Dairy Federation). 1997. Guidance for the standardized description of microbial inhibitor test. IDF Grup E-503. Antibiotics, Appendix 3: 1-16.
- 79.** IDF-FIL (International Dairy Federation). 2002. Guidance for the standardized description of microbial inhibitor test”. IDF-FIL, Bull N° 183. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica.
- 80.** IFCN 2012. Dairy Report of the International Farm Comparison Network.
- 81.** Ingham, E. R., Coleman, D. C. 1984. Effects of streptomycine, cycloheximide, fungizone, captan, carbofuran, cygon, PCNB on soil microorganisms. *Microb. Ecol.* 10, 345-358.
- 82.** Jacquet, J., Auxepaules, M., 1978. “Le problème de la pollution du lait par les antibiotiques. État actuel de la question”. *Bull. Acad. Vét. de France*, 51: 73-79.
- 83.** Jalava, J.; Kataja, J.; Seppala, H.; Huovinen,P. 2001. *In Vitro* Activities of the Novel Ketolide Telithromycin (HMR 3647) against Erythromycin-Resistant Streptococcus Species- Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 45 (3) p:789-793.
- 84.** 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
- 85.** Jemba, P. K. (2002). The potential impact of veterinary human therapeutic agents in manure biosolids on plants grown on arable l. a review. *Agric. Ecosyst. Environ.* 93, 267-278.

- 86.** Jones, G. M. 1999. On farm test for drug residues in milk, Virginia cooperative extension, Knowledge for the common wealth, Virginia Polytechnic and State University, U.S.A.
- 88.** Kemper, 2008. Review: Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecological indicators*, 8: 1-13.
- 89.** Kennedy, D. G., Cannavan, A., McCracken, R. J. 2000. Regulatory problems caused by contamination, a frequently overlooked cause of veterinary drug residues. *J. Chromatogr. A* 882, 37-52.
- 90.** Khaskheli, M., Malik, R., Arain, M., Soomro, A y Arain, A. 2008. Detection of  $\beta$  – Lactam Antibiotic Residues in Market Milk. *Pakistan Journal of Nutrition*, 7 (5): 682-685.
- 91.** Kim, D. S.; Park, M. S. 1998. Antibiotic use at a pediatric age. *Yonsei Medical Journal* 39: 595–603.
- 92.** Kumar, K., S.C.Gupta, Y. Cher, A.K. Singh. 2005. Antibiotics in agriculture their impact on the terrestrial environment. *Adv. Agron.* 87 (in press).
- 93.** Kümmerer K., Al-Ahmad A., Mersch-Sundermann V. 2000. Biodegradability of some antibiotics, elimination of the genotoxicity and affection of wastewater bacteria in a simple test. *Chemosphere* 40: 701-710.
- 94.** Kunin C. M.; Finland M. 1961. Clinical pharmacology of the tetracycline antibiotics. *ClinPharmacolTher.* 2:51-56.
- 95.** Lacroix, D. 1995. Le dépistage des antibiotiques à la ferme le producteur de lait québécois. *Le Producteur de lait Québécois*: 30–31.
- 96.** Lamp, K. C.; Bailey, E. M.; Rybak, M. J. 1992. Ofloxacin clinical pharmacokinetics. *ClinPharmacokinet.* 22: 32–46.
- 97.** Lara, F.; García-Campaña, A.; Alés-Barrero, F.; Bosque-Sendra, M.; García-Ayuso, L.2006. Multiresidue Method for the Determination of Quinolone Antibiotics in Bovine Raw Milk by Capillary Electrophoresis-Tandem Mass Spectrometry- *Anal. Chem.*78, 7665-7673.
- 98.** Leclercq, R.; Carlier, C.; Duval, J.; Courvalin, P. 1985. Plasmid-mediated resistance to lincomycin by inactivation in *Staphylococcus haemolyticus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 28: 421–424.

- 99.** Letavic, M. A.; Bronk, B.S.; Bertsohe, C. D. 2002. Synthesis and activity of a novel class of tribasic macrocyclic antibiotics: the triamilides. *Bioorg. Med. Chem. Lett*, 12: 2771-2774.
- 100.** 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.
- 101.** Littlefield, N. A.; Sheldon, W. G.; Allen, R.; Gaylor, D. W. 1990. Chronic toxicity/carcinogenicity studies of sulphamethazine in Fischer 344/N rats: two-generation exposure. *Food Chem. Toxicol.* 28: 157-167.
- 102.** Liu, M.; Douthwaite, S. 2002. Activity of the ketolidetelithromycin is refractory to erm monomethylation of bacterial rRNA. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 1629-33.
- 103.** Long, A. R.; Hsieh, L. C.; Malbrough, M. S.; Short, C. R.; Barker, S. A. 1990. Multiresidue method for the determination of sulphonamides in pork tissue. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 38: 423-426.
- 104.** Löscher, W. 1994. Animal experiments in the development and evaluation of veterinary drugs. *Tierärztliche-Umschau.* 49: 67-68.
- 105.** Luchter F J. 2004. Introducción al estudio de las enfermedades infecciosas: enfermedades infecciosas de los rumiantes. 1° ed. Edición Autor. Buenos Aires. 269 p.
- 106.** Luitz, M.; Suhren, G.; 1995a. Advantages of photometric evaluation of microbial inhibitor test. 177-181. *In Residues of Antimicrobial Drugs and Other Inhibitors in Milk.* IDF S. I. N° 9505. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica.
- 107.** Luitz, M.; Suhren, G. 1995b. Evaluation of microbial inhibitor test with indicator in microtitre plates by photometric measurements. *Milchwissenschaft*, 50: 465-470.
- 108.** Luitz, M.; Suhren, G.; Heeschen, W. 1995. Interactions of antimicrobials in milk - consequences for the detection with Delvotest SP special. *Proceedings of the IDF-Symposium in Kiel, Alemania, agosto 28-31.* Bruselas, Bélgica.
- 109.** Lyn, R. Y. 1992. A perspective of penicillin allergy. *Arch. Intern. Med.* 152: 930-937.
- 110.** Mc. Cracken, D. I., Foster, G. N. 1993. The effect of ivermectin on the invertebrate fauna associated with cow dung. *Environ. Toxicol. Chem.* 12, 73-84.



- 111.** Macri, A y Mantovani, A. 1995 The safety evaluation of residues of veterinary in farm animal tissues and products. *Journal Experimental Clinical Cancer Research*, 14 (2): 119-129.
- 112.** MAGyP, 2013/ [http://64.76.123.202/site/\\_subsecretaria\\_de\\_lecheria/lecheria/04=Pag\\_o\\_por\\_Calidad/07\\_Estadisticas/index.php](http://64.76.123.202/site/_subsecretaria_de_lecheria/lecheria/04=Pag_o_por_Calidad/07_Estadisticas/index.php) Marino M., Castignani, H., Arzubi, a., Rambeaud, O., Álvarez, R., Taverna, M., Rodriguez, M., Suero, M., Iturrioz, G., Mancuso, W., Engler P., Litwin, G., Leonhardt., D., Teran, JC., Rocco, E., Comeron, e., Tosi, JC., Vidal, R., Gutiérrez, L., Centeno, A. 2011.
- 113.** Caracterización de los Tambos Pequeños en la Cuencas Lecheras Pampeanas” Public. Téc. N° 61. ISSN 0485-9057. 48 pag. Mondino, C. 2010.
- 114.** Sistema de Producción de Leche Campo Roca, INTA Rafaela. Castignani y col. 2005. Caracterización de los sistemas de producción lecheros argentinos, y de sus principales cuencas. Asociación Argentina de Economía Agraria. Magerlein, B. J.; Birkenmeyer, R. D.; Kagan, F. 1966. Antimicrob. Agents Chemother. 727-736.
- 115.** Marín, M. y Gudiol, F. 2003. Antibióticos betalactámicos. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 21(1): 42-55.
- 116.** Martínez-Carballo, E.; Gonzalez-Barreiro, C.; Sacharf, S y Gans, O. 2007. Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria. *Environmental Pollution*, 148: 570-579.
- 117.** Mateos, P F., 2002. “Agentes antimicrobianos y microorganismos”. Curso de microbiología. Ingeniería de Alimentos”. <http://geocities.com/CollegePark/Lab/2960/Mic20.htm>
- 118.** Mathew, A G.; Cissell, R y Liamthong, S. 2007. Review: Antibiotic Resistance in Bacteria Associated with Food Animals: A United States Perspective of Livestock Production. *Foodborne pathogens and disease*, 4 (2): 115-133.
- 119.** Mäyrä-Mäkinen, A 1995. The Valio T 101. En: Inhibitory substances in milk – current analytical practice. *Bulletin of the IDF N° 283*. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica. 29-31.
- 120.** Merck y Col. 2007. El Manual Merck de Veterinaria. 6ª ed.
- 121.** Mestorino, O. N.; Errecalde, J. O. 2004. Tilmicosina: un nuevo antibiótico macrólido de uso veterinario. *Analecta Veterinaria*, 24 (2): 21-28.

- 122.** Molina, M.; Althaus, R.; Molina, A.; Fernandez, N. 2003. Antimicrobial Agent Detection in Ewes' Milk by the Microbial Inhibitor Test Brilliant Reduction Test- BRT AiM<sup>®</sup>. *Int. Dairy J.*, 13: 821-826
- 123.** 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.
- 124.** Moretain, JP.; 1996. Elimination des médicaments vétérinaires dans le lait. XIII Reunión de técnicos especialistas en control de mamitis y calidad de leche. Pamplona, 25 de octubre 1996. En: MOLINA, M.P.; ALTHAUS, R.L.; ZORRAQUINO, M.A.; DONATE, M.I.; FERNÁNDEZ, N. y PERIS C. (1998). Estudio de los métodos de detección de inhibidores en la leche de oveja. *Producción Ovina y Caprina*. XXIII: 159-162.
- 125.** Mourot y Loussouarn, 1981; Sensibilité des ferments Lactiques aux Antibiotiques utilisés en médecine vétérinaire. *Rec. Med. Vét.*, 157: 175-177
- 126.** Mulazimoglu, L.; Tulkens, P. M.; Van Bambeke, F. 2005. Macrolides. In: Yu, V. L.; Edwards, G.; McKinnon, P. S.; Peloquin C.; Morse G. D. Eds. *Antimicrobial Therapy and Vaccines. Volume II: Antimicrobial Agents*. 2da Edición. ESun Technologies. Pittsburg. USA. p. 243-280.
- 127.** Müller, F.; Jones. 1993. BR-Test and BRT-AS Methods. 24-28. In *Inhibitory substances in milk -current analytical practice*. IDF Bull. N° 283. International Dairy Federation. Bruselas, Belgica.
- 128.** Nagel, O.; Molina, M.P.; Althaus, R L. 2011A. Optimization of bioassay for tetracycline detection in milk by means of chemometric techniques. *Letters in Applied Microbiology* (ISSN 0266-8254). 52: 245-252
- 129.** Nagel, O.; Molina, M.P.; Althaus, R (2011B). Microbial system for identification of antibiotic residues in milk. *J. Food and Drug Analysis* (ISSN 1021-9498). 19(3): 369-375
- 130.** Nawaz, M.; Wang, J.; Zhou, A.; Chaofeng, MA.; Xiaokang, WU.; Moore, J.; Millar, BC y Jiru XU. 2011. Characterization and Transfer of Antibiotic Resistance in Lactic Acid Bacteria from Fermented Food Products. *Current Microbiology*, 62:1081–1089.

- 131.** New HC. New antibiotics; areas of appropriate use. *J Infect Dis* 1987;155:403-17.  
New CH. Quinolonas: nuevos antimicrobianos con amplias posibilidades de uso. *ClinMedNorteam* 1987;71:663-7.
- 132.** Nosetti L., Herrero M. A., Pol M., Maldonado M., Iramain M. S., Flores M. 2002. Cuantificación y caracterización de agua y efluentes en establecimientos lecheros. Demanda de agua y manejo de efluentes. *InVet.* 2002, 4 (1): 37-43.
- 133.** Nouws, J.; Loeffen, G.; Schouten, J.; Van Egmond, H.; Keukens, H y Stegeman, H. 1999. "Testing of raw milk for tetracycline residues". *J. Dairy Sci.*, 81: 2341-2345.
- 134.** Oda y Hiwaki, 1996. Sensibilité des ferments lactiques aux antibiotiques utilisés en médecine vétérinaire. *Rec. Med. Vét.*, 157: 175-177
- 135.** Packham, W.; Broome, M. C.; Limsowtin, G. K. Y.; Roginski, H. 2001. Limitations of standard antibiotic screening assays when applied to milk for cheesemaking. *Australian Journal Dairy Tech.* 56: 15-18.
- 136.** Panjarathinam, R. N. 1974 in *A Text Book of Homeopathic pharmacy*. Ed. Mandal & Mandal. First Publication. New Delhi, India, 414 pp.
- 137.** Paredes Gago, R. 2013. Prevalencia de enterobacteriáceas productoras de betalactamasas de espectro extendido (Blee) en la clínica Good Hope durante el periodo marzo-agosto del 2012.
- 138.** Pascal-Sanders. 2005. Chapter 33: Antibiotic Use in Animals - Policies and Control Measures Around Europe. *Antibiotic Policies: Theory and Practice*. Edited by Gould and van der Meer Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York. 649-672 p
- 139.** Pérez Trallero, E.; Iglesias, L. 2003. Tetraciclinas, sulfamidas, metronidazol. Servicio de Microbiología. Hospital Donostia. San Sebastián. España. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*; 21(9): 520-529.
- 140.** Perreten, V.; Teuber, M. 1995. Antibiotic resistance bacteria in fermented dairy products a new challenge for raw milk cheese. En: *Residues of antimicrobial drugs and other inhibitors in milk*. IDF S.I. 9505. Kiel, Germany. p: 144-148.
- 141.** Pikkemaat, M.; Rapallini, M., Ostra-Van Dijk, S y Eleferinka, J. 2009. Comparison of three microbial screening methods for antibiotics using routine monitoring samples. *Analytica Chimica Acta*, 637: 298-304.

- 142.** Prescott, J. F. 2002. Lincosamidas, macrólidos y pleuromutilinas. En: Prescott, J.F.; Baggot, J. D.; Walter, R. D. Editores. *Terapéutica Antimicrobiana en Medicina Veterinaria*. Ed. Intermédica. 3ª Ed. Argentina. p: 204-232.
- 143.** Prescott, J.; Baggott, J.; Walker, R. 2002. *Terapéutica Antimicrobiana en Medicina Veterinaria*. Ed. Inter-Médica. Iowa, USA
- 144.** Rang H. P., Dale M. M., Ritter J. M. 2000. Quimioterapia de enfermedades infecciosas y malignas. 742-748, *In Farmacología*, 4ª ed. Ed Harcourt. Madrid.
- 147.** Región CREA Santa Fe Centro 2012. Proyecto Recursos Humanos en Tambos. Jornada de Actualización Técnica, Colonia Vignaud, Santa Fe. - Sanchez y col. (2011) La lechería argentina: estado actual y su evolución (2008 a 2011). Asociación Argentina de Economía Agraria.
- 148.** Reglamento 2377/90/CEE (CEE, 1990) en los anexos I, II o III y IV.
- 149.** REGLAMENTO UE N° 37/2010, CÓDIGO ALIMENTARIO ARGENTINO ART. 556, RES 2270, 14.9.83
- 150.** Renard, L. 1994. Modelisation de la relation pharmacocinetique-pharmacodynamie en antibiotherapie veterinaire (these pour le diplôme de Docteur de L'Université de Limoges, specialite: Sciences pharmaceutiques). Faculte de Pharmacie, Universidad de Limoges. France.
- 151.** Rubio, M.; Boggio, J. C. 2009. *Farmacología Veterinaria*, 2ed. Córdoba, Argentina. EDUCC. Cap: 48, p 513. Cap: 49 p 531, 534 y 545. Cap: 50, p550.
- 152.** Ruiz, V.; Moreno, G. 2005. *Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. Ed. médica panamericana. Madrid. p: 209-210.
- 153.** Sádaba, B.; Azanza, J. R. 2005. Antibióticos macrólidos y otros antibióticos. En: Leza Cerro, J.C.; Lizasoain Hernández, I.; Lorenzo Fernández, P.; Moreno González, A.; Moro Sánchez, M. A. (eds): Velásquez. *Farmacología básica y clínica* (20ª Ed) Buenos Aires, Ed. Panamericana, p. 825-839.
- 154.** Samuelsen, O. B., Torsvik, V, Ervik, A. 1992. Long-range changes in oxytetracycline concentration bacterial resistance toward oxytetracycline in a fish farm sediment after medication. *Sci. Total Environ.* 114, 25-36.
- 155.** Sarmah, A K., Meyer, MT.; y Boxall, A B A. 2006. Review: A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere*, 65: 725–759.

- 156.** Schlossberg, D. 1995. Azithromycin and Clarithromycin. *Med Clin N Am*; 79: 803-815.
- 157.** Schumacher, W.E. 1968. American Cyanamid Company Report FD 16: 352-378. Experiment A-67-36-FT.
- 158.** Schwarz, S.; Chaslus-Dancla, E. 2001. Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Veterinary Research*. 32: 201–225.
- 159.** SENASA (Servicio de Sanidad y Calidad Agroalimentaria). 1999, 2000. Normativa UE Tambos UE4, UE5, UE6. Parte de Supervisión. p: 10-21.
- 160.** SENASA (Servicio de Sanidad y Calidad Agroalimentaria). 1999. Decreto 815/1999. 24 de julio 1999. pp. 14.
- 161.** 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>.
- 162.** 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>.
- 163.** 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.
- 164.** Shryock, T. R.; Mortensen, J. E.; Baumholtz, M. 1998. The effects of macrolides on the expression of bactericidal virulence mechanisms. *J. Antimicrob. Chemother*. 41: 505-512
- 165.** Sischo, W. 1996. Quality Milk and Test for Antibiotic Residues. *J Dairy Sci*; 79(6): 1065-1073.
- 166.** Smink, D. 1979. A standard test for the detection of antibiotic residues in milk. *North European Dayry J*. 3: 7-8.
- 167.** Smith, J. T.; Lewin C. S. 1988. *The Quinolones*. Editor V. T. Andriole, Academic Press, London, p: 23–82.
- 168.** Sorgel, F.; Jaehde, U.; Naber, K. G.; Stephan, U. 1989. Pharmacokinetic disposition of quinolones in human body fluids and tissues. *Clin. Pharmacokinet*. 16: 51S–68S.

- 169.** Stein, G. E. 1996. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of newer fluoroquinolones. *Clin. Infect. Dis.* 23 (1): 19-24.
- 170.** Stein, G. E.; Havlichek, D. H. 1998. Newer oral antimicrobials for resistant respiratory tract pathogens. Which show the most promise? *Postgrad Med.* 103(6): 67-70,74-76.
- 171.** Suhren, G. 1995. Possibilities and limitations of microbiological inhibitor test..En: *Residues of Antimicrobial Drugs and Other Inhibitors in Milk.* IDF S.I. N° 9505. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica. 159-171.
- 172.** Sullivan TJ.; Wednet, J.; Shatz , G S.; Yecies L D.; Parker C W. 1981. "Skin testing to penicillin allergy". *J.Allergy. Clin. Immunol.*, 68: 171-180.
- 173.** Sumano, H. S.; Ocampo, L. 1997. Quimioterapia de las enfermedades microbianas. 118-137.En: *Farmacología Veterinaria*, 2ª ed. Ed. McGraw-Hill Interamericana. Madrid.
- 174.** Thiele, S.Beck, I.-C. 2001. Wirkung en pharmazeutischer Antibiotika auf die Bodenmikroflora – Bestimmung gmittelsaus gewählterboden biologischer Testverfahren. *Mitteilgn. Dtsch. Bodenkundl. Gesellsch.* 96, 383-384.
- 175.** Thompson, B. 1987. Cephalosporin, Carbapen em and Momobactam Antibiotics. *Clin. Proc.* 62: 821-832.
- 176.** Tollefson L., Karp B. E. 2004. Human health impact from antimicrobial use in food animals. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 34: 514-521.
- 177.** Tsai, C.; Kondo, F. 2001. Improved Agar Difusión Method for Detecting Residual Antimicrobial Agents. *J. Food Prot.*, 64: 361-366.
- 178.** Vacher, P Y.; & Jemmi, T.1997. Abaque pour l'analyse d'antibiotiques et de sulfamides par la méthode modifiée du test à 4 plaques et détermination des limites de détection de la méthode. *Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, 88(5), 540-55
- 179.** Van Os, J.; Beukers R. 1980. A multitest system for detection of antibiotics in milk. *J. Food Prot.* 43: 510-511.
- 180.** Villarroel, F., & Yohanna, M. 2012. Frecuencia de Aislados de Escherichia Coli Productoras de Betalactamasas de Espectro Expandido en Secreciones Vaginales de Pacientes Que Acuden a La Consulta Externa de La Maternidad San José, SAN FÉLIX, ESTADO BOLÍVAR.

- 181.** Viola, C y Devincents, S J:2006. Overview of issues pertaining to the manufacture, distribution, and use of antimicrobials in animals and other information relevant to animal antimicrobial use data collection in the United States. *Preventive Veterinary Medicine*, 73 (2–3): 111–131.
- 182.** Wang, J.; Leung, D. 2007. Analyses of macrolide antibiotic residue in eggs, raw milk, and honey using both ultra-performance liquid chromatography/ quadrupole time-of-flight mass spectrometry and high-performance liquid chromatography/ tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21: 3213-3222.
- 183.** Wolfson, J. S.; Hooper, D. C. 1989. Fluoroquinolone antimicrobial agents. *Clín. Microbiol. Rev.* 2: 378-424.
- 184.** Wright, A.; Wilkoushe, J. 1987. The Penicillins. *Mayo ClinProc*; 62: 806-819.
- 185.** [WWW.ALIMENTOSARGENTINOS.GOV.AR](http://WWW.ALIMENTOSARGENTINOS.GOV.AR)
- 186.** Young, L. S. 1994. Tratamiento antimicrobiano. En: Wyngaarden, J.; Lloyd, H. S.; Bennett, J. Eds. *Cecil: tratado de Medicina Interna*. 19 ed. Nueva Editorial Interamericana. México, DF, México. p: 1859-1872.
- 187.** 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.*, 1055: 109-114.
- 188.** Ziv, G.; Rasmussen, F. 1974. Distribution of Labeled Antibiotics in Different Components of Milk Following Intramammary and Intramuscular Administrations. *J. DairySci.* 58(6): 938-946.
- 189.** Zorraquino, M. 1997. “Validación BR-Test: efecto azidiol y tiempos de incubación”. Conferencia XIV Reunión de Técnicos especialistas en control de mamitis y calidad de la leche. Mallorca, España.
- 190.** 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.
- 191.** Zorraquino, M.A. 2005. Inactivación térmica de sustancias antimicrobianas en leche. Tesis Doctoral. Universidad Pública de Navarra. España.
- 192.** Zorraquino, M.; Roca, M.; Castillo, M.; Althaus, R.; Molina, M. 2008a. Effect of thermal treatments on the activity of quinolones in milk. *Milchwissenschaft.* 63: 192-195.

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

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



