



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

RELEVAMIENTO DE ANTIBIÓTICOS EN LA LECHE
PROCEDENTE DE PEQUEÑOS TAMBOS
DE LA REGIÓN CENTRO DE SANTA FE
Y SU RELACIÓN CON
LA CALIDAD HIGIÉNICO-SANITARIA
Y FACTORES AMBIENTALES

Autor:
M.V. Hilda Inés Henzenn
TESIS DE MAESTRIA en Ciencias Veterinarias

Esperanza, 2013



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

Maestría en Ciencias Veterinarias
Mención en Salud Animal

RELEVAMIENTO DE ANTIBIÓTICOS EN LA LECHE
PROCEDENTE DE PEQUEÑOS TAMBOS
DE LA REGIÓN CENTRO DE SANTA FE
Y SU RELACIÓN CON
LA CALIDAD HIGIÉNICO-SANITARIA
Y FACTORES AMBIENTALES

Autor: M.V. Hilda Inés Henzenn
TESIS DE MAESTRIA

Director Dr. Orlando Guillermo Nagel

Codirector Dr. Rafael Lisandro Althaus

Miembros del Tribunal de Tesis: Dra. María Pilar Molina Pons

Dr. Diego Díaz David

Msc. Eduardo Elizalde

Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias Veterinaria

Esperanza, 2013

DEDICATORIA

A mis seres queridos, que iluminan mi camino.

AGRADECIMIENTOS

- Al Proyecto de Mejoramiento de la Enseñanza en Veterinaria (PROMVET) de la Universidad Nacional del Litoral, por la beca económica que me permitió realizar el postgrado.
- A Orlando Nagel y Rafael Althaus, por el tiempo, enseñanzas, paciencia, respeto y dedicación.
- A la empresa ResScreen® S.R.L. por facilitarme los métodos microbiológicos necesarios para llevar a cabo la totalidad de las muestras analizadas.
- Al Laboratorio LA.R.S.A. – A.L.E.Co.L. (Laboratorio Regional de Servicios Analíticos – Asociación del Litoral de Entidades de Control Lechero) Esperanza, por su colaboración y predisposición desinteresada.
- A mi familia y amigos, quienes me alentaron, acompañaron y ayudaron incondicionalmente.
- A mis compañeros integrantes de la Facultad de Ciencias Veterinarias, que me alentaron y colaboraron con este emprendimiento.

ÍNDICE GENERAL

I. Introducción	1
II. Revisión bibliográfica	5
II.1. Producción de Leche bovina	5
II.2. Enfermedades del bovino productor de leche	10
II.2.1. Mastitis	13
II.2.2. Retenciones de placenta y metritis	16
II.2.3. Enfermedades podales	18
II.2.4. Otras enfermedades	20
II.3. Uso de antibióticos	21
II.3.1. Concepto de antibióticos	21
II.3.2. Beneficios que producen los antibióticos en Medicina Veterinaria	22
II.3.3. Antibióticos más empleados en el tratamiento del ganado vacuno	24
II.3.3.1. Antibióticos utilizados para el tratamiento de mastitis	24
II.3.3.2. Antibióticos utilizados para el tratamiento de retenciones de placenta y metritis	26
II.3.3.3. Antibióticos utilizados para el tratamiento de enfermedades podales	27
II.3.3.4. Antibióticos utilizados para el tratamiento de otras enfermedades	28
II.3.4. Efectos adversos de la presencia de ATBs en la leche	30
II.3.4.1. Problemas en los procesos industriales	30
II.3.4.2. Problemas económicos	32
II.3.4.3. Problemas medioambientales	33
II.3.4.4. Problemas sobre la salud del consumidor	34

II.3.5. Aspectos legales sobre los residuos de ATBs en la leche a nivel mundial	37
II.3.5.1. Reglamentación en Argentina	40
II.3.6. Métodos utilizados para la detección de antibióticos en la leche	42
II.3.7. Frecuencia de la presencia de inhibidores y antibióticos en la leche	46
III. Objetivos	51
IV. Materiales y métodos	52
IV.1. Relevamiento de la presencia de residuos de ATBs en pequeños tambos de la zona centro de Santa Fe	52
IV.1.1. Toma de las muestras de leche	52
IV.1.2. Análisis de antibióticos en la leche mediante el Sistema ResScreen®	53
IV.1.3. Fundamentos del Sistema ResScreen®	54
IV.1.4. Análisis estadístico de los resultados	56
IV.2. Efecto de la calidad higiénico – sanitario de leche sobre la presencia de residuos de ATBs en la leche	57
IV.2.1. Determinaciones analíticas	57
IV.2.2. Análisis estadístico de los resultados	60
IV.3. Efecto de variables ambientales sobre las frecuencias de resultados positivos de antibióticos en leche	61
IV.3.1. Análisis estadístico de los resultados	62
IV.3.1.1. Efecto de la temperatura ambiente y las precipitaciones sobre los RCS y RG	62
IV.3.1.2. Efecto de la temperatura ambiente y las precipitaciones sobre las frecuencias de antibióticos en la leche	63

V. Resultados y discusión	64
V.1. Relevamiento de la presencia de residuos de ATBs en pequeños tambos de la zona centro de Santa Fe	64
V.1.1. Inhibidores presentes en la leche	64
V.1.2. Identificación de la naturaleza de los residuos presentes en la leche	69
V.2. Efecto de la calidad higiénico-sanitario de leche sobre la presencia de residuos de ATBs	80
V.2.1 Composición de la leche	80
V.3. Efecto de variables ambientales sobre las frecuencias de antibióticos en leche	92
V.3.1 Características climáticas de la región	92
V.3.2. Efecto de las variables climáticas sobre los RCS y RG	96
V.3.3. Efecto de las variables climáticas sobre la frecuencia de antibióticos en la leche	103
VI. Conclusiones	109
VII. Bibliografía	111

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla II.1.	Producción y utilización de leche en Argentina.....	7
Tabla II.2.	Distribución porcentual de empresas según la capacidad de procesamiento de leche cruda (litros/día) por provincias.....	8
Tabla II.3.	Distribución de la producción y los tambos de la cuenca centro santafesina	10
Tabla II.4.	Porcentajes de utilización de antibióticos para tratamientos de mastitis	26
Tabla II.5.	Porcentajes de utilización de antibióticos para tratamientos de retenciones de placenta y metritis	27
Tabla II.6.	Frecuencias porcentuales de utilización de antibióticos para tratamientos de enfermedades podales	28
Tabla II.7.	Porcentajes de utilización de antibióticos para tratamientos de enfermedades respiratorias	29
Tabla II.8.	Límites Máximos de Residuos (LMRs) establecidos por el Codex Alimentarius, Unión Europea y tolerancia en USA de antimicrobianos en leche	39
Tabla II.9.	Límites de detección ($\mu\text{g}/\text{kg}$) de diferentes métodos de inhibición microbiológica	45
Tabla II.10.	Evolución de la presencia de antibióticos en leche en diferentes países	48
Tabla IV.1.	Interpretación de los resultados mediante el sistema microbiológico ResScreen®.....	55
Tabla V.1.	Frecuencias absolutas y relativas de inhibidores en leche bovina analizadas por el Sistema ResScreen®	64
Tabla V.2.	Clasificación de las frecuencias de inhibidores en leche según el sistema microbiológico ResScreen®	70
Tabla V.3.	Parámetros estadísticos obtenidos mediante el modelo de regresión logística aplicado a las distribuciones de frecuencia de ATBs en leche durante el año 2010	76
Tabla V.4.	Ecuaciones matemáticas obtenidas mediante el modelo de regresión logístico que expresan las distribuciones de frecuencias de ATBs en	

	leche durante el año 2010	77
Tabla V.5.	Parámetros estadísticos de los componentes químicos de la leche bovina	80
Tabla V.6.	Parámetros estadísticos obtenidos mediante la aplicación de método de regresión logística a las distribuciones de frecuencia de ATBs en leche en el año 2010	87
Tabla V.7.	Ecuaciones matemáticas obtenidas mediante el modelo de regresión logístico que expresan las distribuciones de frecuencias de tetraciclinas en leche como una función de RCS.	87
Tabla V.8.	Parámetros estadísticos de las temperaturas (máximas y mínimas) y las precipitaciones, a lo largo del año 2010, en la cuenca centro santafecina	92
Tabla V.9.	Ecuaciones que representan los efectos de las temperaturas y precipitaciones sobre los Recuentos de Células Somáticas y Recuentos de Gérmenes	97
Tabla V.10.	Parámetros estadísticos obtenidos mediante la aplicación del método de regresión logística a las distribuciones de frecuencia de ATBs en leche en el año 2010	104
Tabla V.11.	Ecuaciones matemáticas obtenidas mediante el modelo de regresión logístico que expresan las distribuciones de frecuencias de ATBs en leche durante el año 2010	104

ÍNDICE DE IMAGENES

Figura II.1. Distribución de Unidades Productivas con Actividad de Tambo Bovino	6
Figura II.2. Prevalencia de enfermedades en los establecimientos lecheros.....	12
Figura II.3. Prevalencia de las lesiones podales en establecimientos lecheros	19
Figura IV.1. Frecuencias absolutas de las muestras de leche bovina analizadas por el sistema ResScreen® en el año 2010	53
Figura V.1. Distribución de las frecuencias de inhibidores en muestras de leche bovina analizadas por el Sistema ResScreen®	66
Figura V.2. Distribución de frecuencia de antibióticos en muestras de leche bovina analizadas con el Sistema ResScreen® durante 2010.....	75
Figura V.3. Ajustes de la distribución de las frecuencia de antibióticos en muestras de leche bovina durante el año 2010 mediante el Modelo de Regresión Logística	79
Figura V.4. Distribución de frecuencias de los componentes químicos de la leche durante el año 2010	83
Figura V.5. Distribución anual de los recuentos de células somáticas y recuentos de germenos totales de las muestras de leche de los pequeños tambos de la cuenca centro santafecina	85
Figura V.6 Modelos de regresión logística que relaciona la distribución de la frecuencia de tetraciclinas en muestras de leche bovina durante el año 2010 y el Recuento de Células Somáticas	88
Figura V.7. Temperaturas (°C) máximas y mínimas registradas durante el año 2010 por en la Estación Agrometeorológica dependiente de EER-INTA Rafaela	94
Figura V.8. Precipitaciones (mm) medidas durante el año 2010 en la Estación Agrometeorológica dependiente de EER-INTA Rafaela	95
Figura V.9. Efecto de la temperatura y las precipitaciones sobre los RCS y RG	98
Figura V.10. Efectos de las temperaturas ambientales y/o precipitaciones sobre la probabilidad de detectar residuos de antibióticos en leche	106

RESUMEN

Los actuales sistemas intensivos de producción láctea implican un mayor uso de medicamentos para prevenir y combatir las enfermedades debido al hacinamiento. Por su parte, los consumidores demandan alimentos sanos y seguros, a fin de evitar que los residuos de antibióticos en los alimentos puedan ocasionar problemas sobre la salud, tales como, desarrollo de antibioresistencias, disturbios gastrointestinales, reacciones alérgicas que pueden producir el shock anafiláctico. De esta forma, el control de los residuos de antibióticos en la leche constituye una medida de seguridad, tanto para los consumidores, como para los productores lácteos.

En el presente trabajo se analizaron 3309 muestras de leche procedentes de pequeños tambos de la región centro santafesina durante el año 2010 con el método microbiológico ResScreen[®]. Los resultados señalan que los residuos más frecuentes son betalactámicos (BTs: 3,02 %), tetraciclinas (TCs: 3,23 %) y sulfamidas (SAs: 2,42 %). Además, se evidencia una periodicidad con máximos en los meses de verano (BTs: 6,2 %, TCs: 6,0 % y SAs: 4,0 %), primavera (BTs: 4,0 %, TCs: 3,8 % y SAs: 4,0 %) y mínimos durante el invierno (BTs: 1,0 %, TCs: 2,0 % y SAs: 0,8 %).

También se analizaron los efectos de variables higiénico-sanitario (RCS: recuentos de células somáticas y RG: recuentos de gérmenes) y factores ambientales (temperatura y precipitación) sobre estas frecuencias de antibióticos en leche. El modelo de regresión lineal múltiple señaló un efecto significativo de la temperatura y precipitación ($p < 0,05$) sobre los RCS y RG. Durante las temporadas calurosas y lluviosas aumentaron ambos recuentos asociados a una menor inmunidad de la ubre (RCS) y una mayor proliferación ambiental de gérmenes (RG).

Además, el modelo de regresión logística señaló que las mayores frecuencias de residuos de betalactámicos y tetraciclinas aumentan con las precipitaciones, mientras que las frecuencias de sulfamidas se incrementan con las temperaturas, característico de los veranos calurosos y lluviosos.

En síntesis, las altas temperaturas y precipitaciones del verano aumentan la probabilidad de hallar residuos de antibióticos en la leche debido a su impacto negativo sobre el confort del ganado vacuno, que aumenta los riesgos de enfermedades infecciosas tales como la mastitis ambiental.

Se sugiere proponer nuevas estrategias analíticas para un control más eficiente de los residuos de antibióticos en leche durante los meses de verano y primavera a fin de garantizar la inocuidad y evitar efectos negativos sobre la salud pública.

Palabras claves: Antibióticos en leche, factores ambientales, variables higiénico-sanitarias, betalactámicos, tetraciclinas, sulfamidas.

SUMMARY

Current intensive dairy production systems involve greater use of medications to prevent and to combat disease due to overcrowding. Moreover, consumers demand healthy and safe food in order to prevent antibiotic residues in food may cause health problems, such as development of resistance to antibiotics, gastrointestinal disorders, allergic reactions that can cause anaphylactic shock. Thus, the control of antibiotic residues in milk provides a measure of safety, both for consumers and for dairy farmer.

In this paper we analyzed 3309 samples of milk from small dairy farms of central Santa Fe during 2010 with the ResScreen[®] microbiological method. The results indicate that residues more frequent are betalactams (BTs: 3,02 %), tetracyclines (TCs: 3,23 %) and sulfonamides (SAs: 2,42 %). It also demonstrates a periodicity with maximums in summer (BTs: 6,2 %, TCs: 6,0 % y SAs: 4,0 %), spring (BTs: 4,0 %, TCs: 3,8 % y SAs: 4,0 %) and minimum in winter (BTs: 1,0 %, TCs: 2,0 % y SAs: 0,8 %).

Also, the effects of hygienic-sanitary variables (SCC: somatic cell counts and BC: bacterial counts) and environmental factors (temperature and precipitation) on frequencies of antibiotics in milk were analyzed. The multiple linear regression model indicated a significant effect of the temperature and precipitation ($p < 0.05$) on the SCC and BC. During the warm and rainy seasons increased both recounts associated with decreased immunity of the udder (SCC) and a higher environmental proliferation of germs (BC).

In addition, the logistic regression model indicated that the higher frequencies of betalactams and tetracyclines residues increase with rainfall, whereas the

sulfonamides frequencies increase with temperatures characteristic of warm and rainy summer.

In synthesis, high temperatures and rainfall of the summer increment the probability of finding antibiotic residues in milk due to its negative impact on the comfort of neat cattle, which increases the risk of infectious diseases such as environmental mastitis.

New analytical strategies for more efficient control of antibiotic residues in milk during the spring and summer months are suggested in order to ensure safety and avoid negative effects on public health.

Keywords: Antibiotics in milk, environmental factors, hygienic-sanitary variables, betalactams, tetracyclines, sulfonamides.

I. INTRODUCCIÓN

Las personas enfermas valoran positivamente a los antibióticos (ATBs) puesto que les confieren sensación de seguridad ante las enfermedades infecciosas. Esta actitud positiva frente a estas sustancias farmacológicas activas también se extiende a los profesionales veterinarios que atienden a los animales domésticos.

El uso de medicamentos veterinarios, y concretamente aquellos de tipo antimicrobianos (antibióticos, sulfamidas, quinolonas, etc.) representa una práctica muy habitual en la explotación ganadera (Young, 1994; Cordiés Jackson *et al.*, 1998). Para el ganado productor de leche, los ATBs se utilizan principalmente en tratamientos curativos de infecciones microbianas en la glándula mamaria, o bien, en tratamientos de tipo preventivos en el momento del secado, para evitar la aparición de dichas patologías en la lactación siguiente (Van Eenennaam *et al.*, 1993; Zwald *et al.*, 2004; Sawant *et al.*, 2005). Además, se emplean para el tratamiento de otras patologías, tales como metritis, neumonías, afecciones podales, heridas postoperatorias, etc. (Zorraquino *et al.*, 2007).

La aplicación de estos tratamientos farmacológicos; según la composición intrínseca del fármaco, excipiente, dosis y vía de administración; genera residuos (sustancia original y/o metabolitos) que pueden persistir durante un mayor o menor tiempo, tanto en los animales tratados como en los productos elaborados (Debackere, 1995; Sanders, 2005).

Los problemas que pueden ocasionar los de residuos de ATBs se han planteado desde hace varias décadas. Así, por ejemplo, Doan en el año 1956 menciona los posibles riesgos que ocasionan la presencia de ATBs en la leche.

Introducción

En efecto, los residuos de ATBs en leche pueden ser tóxicos y peligrosos para la salud humana puesto que pueden provocar procesos de alergias que, en casos extremos, pueden llevar a la anafilaxia (Demoly y Romano, 2005; Wilke *et al.*, 2005). También, los residuos de ATBs provocan perturbaciones pasajeras en la flora intestinal del consumidor (Macri y Mantovani, 1995; Khan *et al.*, 2000) y pueden ser la causa de colonización intestinal de bacterias patógenas u oportunistas (Giraffa, 2004).

Desde el punto de vista tecnológico, estos residuos ocasionan problemas en la fabricación de productos lácteos fermentados, como queso y yogurt (Berruga *et al.*, 2007; Nawaz, *et al.*, 2011; Adetunji, 2011).

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 de 10.000 litros de leche y los grandes silos de almacenamiento de una industria láctea de aproximadamente 200.000 litros (Brouillet, 1994).

Se debe tener en cuenta además que, 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.

Finalmente, se debe considerar que una cantidad importante de estos ATBs administrados originalmente a los animales no se metabolizan y se eliminan por leche, orina y/o heces (Kemper, 2008) pudiendo llegar a contaminar al suelo y a las aguas

Introducción

subterráneas. De este modo, los residuos de ATBs constituyen un problema para el medio ambiente (Martinez-Carballo *et al.*, 2007; Kemper, 2008).

Por estos motivos, la apreciación positiva del consumidor respecto de los ATBs, se ha deslucido en los últimos años, debido al creciente impacto que producen los residuos de estos compuestos sobre la seguridad alimentaria y la conservación del medio ambiente. En este sentido, es de destacar la demanda creciente, por parte de los consumidores, de alimentos inocuos y libres de contaminantes (Ruegg, 2003).

Desde la década de 1990, el concepto de calidad de la leche cobró una importancia creciente (Payne *et al.*, 1999), debido a las exigencias continuas por parte de la industria, los entes fiscalizadores y los consumidores (Berruga *et al.*, 2007; Bradley y Green, 2009). Actualmente, para cuantificar la calidad de la leche se determinan porcentajes de sus componentes químicos, recuentos de células somáticas (RCS), recuentos de gérmenes (RG) y ausencia-presencia de inhibidores. Los valores de RCS y RG son un reflejo del estado sanitario de la ubre y de la limpieza en el tambo, consideradas variables higiénico-sanitarias (Harmon, 1994; Severin, 2008).

Además, los factores ambientales (temperatura, precipitaciones, humedad, vientos) que afectan al ganado bovino lechero durante las distintas estaciones del año, modifican la calidad de la leche (Lacetera *et al.*, 2005). De este modo, la composición de la leche y las variables higiénico-sanitarias muestran variaciones durante el año (Calcedo, 2002).

Conocer la trazabilidad de los alimentos constituye un desafío y una tendencia mundial, a fin de ofrecer al consumidor productos inocuos con mayor calidad, desde la producción primaria.

Introducción

Resulta necesario aunar esfuerzos y recursos tendientes a controlar la presencia de residuos de agentes antimicrobianos para garantizar la calidad de la materia prima que utilizan las empresas lácteas, y por consiguiente, la calidad de los productos que llegan al consumidor.

Existen escasos antecedentes bibliográficos que evalúen la frecuencia de la presencia de residuos de ATBs en la leche y su naturaleza. Además los métodos de inhibición microbiológicos como Delvotest[®] SP (Althaus *et al.*, 2002, 2003), BRT[®] AiM (Althaus *et al.*, 2001, Molina *et al.*, 2003) o Eclipse[®] 100ov (Montero *et al.*, 2005) utilizados para la detección de residuos de antibióticos, no llegan a identificar familias específicas de ATBs (como por ejemplo, betalactámicos, tetraciclinas o sulfonamidas) presentando además una sensibilidad limitada para la detección de tetraciclinas en leche.

Por todo ello, el presente trabajo propone evaluar la frecuencia de aparición de residuos de antibióticos y su naturaleza mediante el empleo simultáneo de los bioensayos ResScreen[®] BT y BS (Nagel *et al.*, 2011b) en la zona centro de Santa Fe y establecer relaciones con las variables higiénico-sanitarias (RCS y RGT) y los factores ambientales (temperaturas y precipitaciones).

II. REVISION BIBLIOGRÁFICA

II.1. Producción de Leche bovina

La leche bovina representa el 83% de la producción mundial de leche y esta actividad productiva resulta muy importante debido a su elevado consumo y volumen de elaboración. Se estima que, durante el año 2012, la producción mundial de leche aumentó 2,6%, semejante a lo ocurrido en el año 2011. En los últimos cinco años, la producción mundial de leche aumentó desde 400 mil toneladas/año (2005) hasta 440 mil toneladas/año (2010) debido en gran parte a un aumento del consumo en América Latina, Asia y Estados Unidos.

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).

Las inversiones realizadas en los últimos años por el sector lácteo en Argentina muestran una tendencia a ocupar un lugar importante en los mercados mundiales de exportación, especialmente en el sector de leche en polvo entera y quesos (FAO, 2010).

Según los informes de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Agroalimentaria (SAGPyA, 2011), la producción láctea de Argentina se concentra principalmente en las provincias de Córdoba, Santa Fe y Buenos Aires, aunque en menor magnitud en las provincias de Entre Ríos y La Pampa (**Figura II.1**).

Actualmente, Argentina dispone de aproximadamente 11.500 tambos, que incluyen 1,8 millones de vacas en ordeño, las cuales produjeron 10.300 millones de

Revisión Bibliográfica

litros de leche en el año 2010, representando un aumento del 2.52% con respecto al año anterior (M.A.G. y P., 2011).

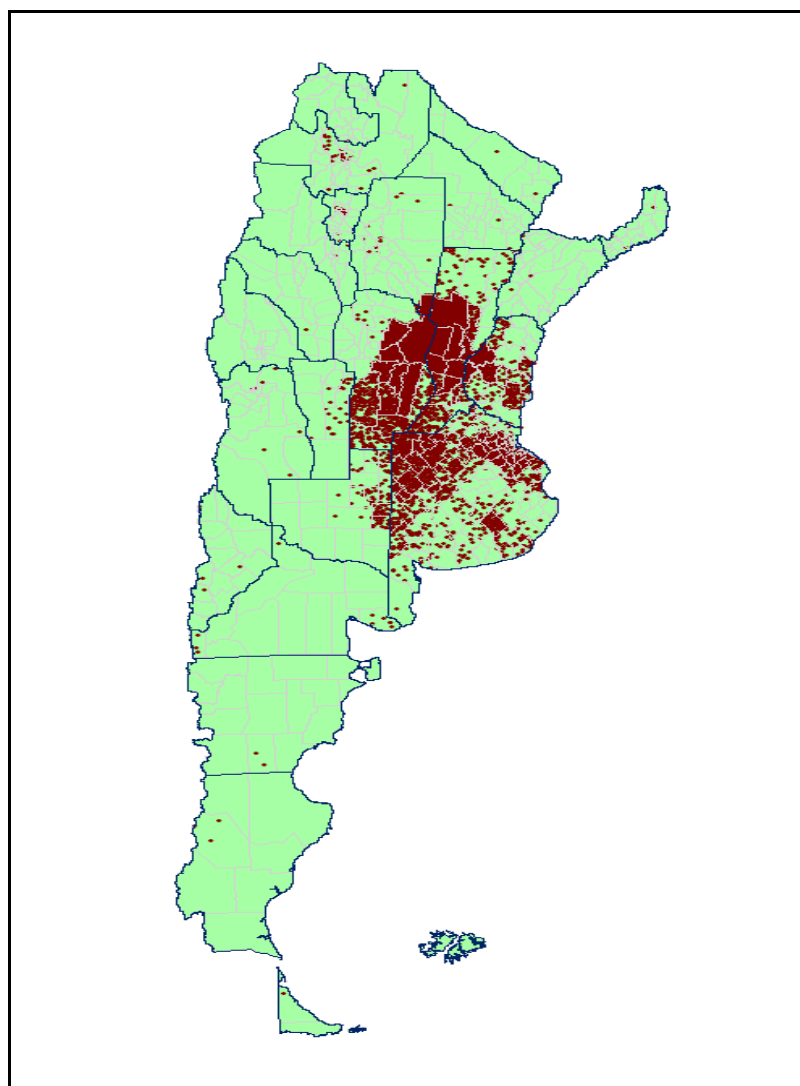


Figura II.1. Distribución de Unidades Productivas con Actividad de Tambo Bovino

Fuente: Sistema Gestión Sanitaria-Dirección Nacional de Sanidad Animal SENASA (12/2008).

La **Tabla II.1** presenta los valores de producción anuales y el volumen de los principales productos lácteos elaborados en Argentina en el periodo 2008 a 2010. Se

Revisión Bibliográfica

puede apreciar que el volumen destinado a la fabricación de productos elaborados (queso, manteca, leche en polvo) es elevado (7.685 millones de litros) en relación al volumen total producido (10.307 millones de litros).

Tabla II.1. Producción y utilización de leche en Argentina

Destino de la leche (litros)	2011 Primer semestre	2010	Tasa de crecimiento	2009	Tasa de crecimiento	2008
Total (10 ⁶ litros)	5.188	10.307	2,52 %	10.054	0,72 %	10.010
Leche fluidas	952	1.855	2,27 %	1.814	-0,30 %	1.824
Productos elaborados	3.843	7.685	2,59 %	7.491	1,00 %	7.438
Leche informal	391	765	2,35 %	748	0,47 %	746

Fuente: www.alimentosargentinos.gov.ar

En lo que respecta a la utilización de la leche, la industria láctea argentina destina el 50% de su producción nacional a la elaboración de quesos. En segundo orden de importancia se destaca la leche en polvo (24 %) seguido de la leche fluida (19 %) (Terán, 2007).

El sector industrial lechero se puede clasificar según el volumen de leche que reciben los diferentes establecimientos productivos. De esta forma, ocupan el primer lugar las grandes empresas (10 a 12 industrias lácteas) que reciben más de 400.000 litros/día cada una de ellas (50-55% de la producción nacional); las medianas empresas (90 a 100 establecimientos) reciben un volumen diario comprendido entre 40.000 y 400.000 litros/día (25 % de la producción nacional) y por último, las pequeñas empresas (1000 establecimientos lácteos) con captación inferior a los 40.000 litros/día

Revisión Bibliográfica

(20 % - 25 % de la producción nacional) que se dedican en forma casi exclusiva a la elaboración de quesos que se destinan al consumo interno (M.A.G. y P., 2011).

En **Tabla II.2**, se detallan la distribución porcentual de empresas según la capacidad de procesamiento de leche cruda (litros/día) de las provincias que poseen la mayoría de las unidades productivas de Argentina. Según se muestra en dicha tabla, en la provincia de Santa Fe se encuentran el 26,7 % de las empresas lácteas de Argentina, superando los porcentajes de otras provincias en las categorías de 50 mil a 250 mil y más de 250 mil litros por día de capacidad de procesado de leche.

Tabla II.2. Distribución porcentual de empresas según la capacidad de procesamiento de leche cruda (litros/día) por provincias

Provincia (litros/día)	5 mil - 20 mil	20 mil - 50 mil	50 mil - 250 mil	más de 250 mil	Total
Buenos Aires	27,8	3,8	3,4	1,1	36,1
Córdoba	15,5	6,6	5,7	0,4	28,2
Santa Fe	10,6	6,4	7,6	2,1	26,7
Entre Ríos	5,1	0,4	0,4	0,2	6,1
La Pampa	2,1	0,8	0	0	2,9
Total	61,1	18	17,1	3,8	100

Fuente: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, MAGyP, departamento de lechería, 2010.

Las principales cuencas lecheras pertenecen a las provincias de Santa Fe, Córdoba, Buenos Aires, Entre Ríos y La Pampa, dónde se localizan actualmente un total de 10.504 tambos que concentran 1.648.742 vacas (CREA, 2011). En el año 2010, la producción en la provincia de Santa Fe alcanzó los 5.400.000 litros diarios obtenida en base a un total de 576 mil vacas en ordeño procedente de 3759 tambos (Cursack *et al.*, 2010).

Revisión Bibliográfica

Dentro de la provincia de Santa Fe se distinguen dos cuencas lecheras, Santa Fe Centro y Santa Fe Sur, que aportan aproximadamente el 90% y el 9% de la producción lechera provincial, respectivamente. La primera abarca a los departamentos Castellanos, Las Colonias, San Martín, La Capital, San Jerónimo, San Justo, San Cristóbal, Nueve de Julio, Vera y General Obligado, mientras que la segunda incluye los departamentos Belgrano, Iriondo, Caseros, General López, Rosario y San Lorenzo (Cursack et al., 2010; M.A.G. y P., 2011).

La cuenca centro-santafesina presenta un clima templado sin estación seca y verano caluroso, según la serie histórica anual del período 1961-1990. Las precipitaciones anuales fluctúan entre los 800 mm y 1200 mm y las temperaturas máximas están comprendidas entre 24 °C y 26 °C y las mínimas anuales entre 10 °C y 14 °C (Magrin *et al.*, 2006). A modo de síntesis se puede establecer que esta región presenta condiciones ambientales propicias para el desarrollo de sistemas de producción lácteos intensivos de bovinos durante gran parte del año (Viglizzo *et al.*, 2005; Herrero y Gil, 2008).

Los establecimientos tamberos se pueden clasificar de acuerdo al nivel de entrega de leche cruda a la industria en pequeños (menores a 1500 litros/día), medianos (comprendidos entre 1500 y 3000 litros/día) o grandes (más de 3000 litros/días) productores según Lacelli *et al.* (2006).

En **Tabla II.3** se detalla el porcentaje de la producción láctea y el porcentaje de los tambos que integran cada categoría de establecimientos en la cuenca centro santafesina de Argentina, lugar donde se muestreó la parte experimental del presente trabajo.

*Revisión Bibliográfica***Tabla II.3.** Distribución de la producción y los tambos de la cuenca centro santafesina

Estrato	Pequeño	Mediano	Grande
Entrega diaria	< 1500	1500-3000	> 3000
Producción (%)	28,0	47,4	24,6
Tambos (%)	49,4	39,3	11,3

Fuente: INTA Rafaela (2006).

En dicha tabla se puede ver que en la cuenca centro santafesina predominan tambos que producen menos de 1500 litros/día, es decir que se clasificarían como pequeños productores (49,4 %), seguido de un 39.3% de tambos que corresponde a la categoría de medianos productores con entrega de leche entre 1500 litros y 3000 litros/día. De esta forma, se deduce que el 75,4 % de la producción láctea de la cuenca centro santafesina proviene de tambos pertenecientes a pequeños y medianos productores.

Sin embargo, aunque se trata de una cuenca leche muy importante en Argentina, prácticamente no se dispone de antecedentes o estudios que evalúen la calidad higiénico-sanitaria y la presencia de xenobióticos en la leche procedente de estos pequeños establecimientos productivos,

II.2. Enfermedades del bovino productor de leche

En un sentido estricto, se define salud como el estado en que un organismo vivo ejerce normalmente todas sus funciones naturales. Así, en producción animal, el término hace referencia al bienestar fisiológico de un animal, concepto amplio que no sólo remite a la ausencia de enfermedades infecciosas, sino que comprende también a

Revisión Bibliográfica

enfermedades no infecciosas, hacinamiento, stress, cansancio, nutrición, disponibilidad de agua, temperatura, limpieza, atención y cuidado, abrigo y a cualquier otro factor que altere dicho bienestar fisiológico (Blood y Radostits, 1992).

En producción animal, el término “enfermedad” puede ser definido como un deterioro de la salud o una alteración del normal funcionamiento del organismo. Independientemente del agente causal de la enfermedad, existen factores predisponentes que facilitan y/o agravan el cuadro clínico. Las enfermedades pueden dividirse en infecciosas, parasitarias, carenciales, inmunológicas, orgánicas, sistémicas, trastornos metabólicos, etc. A su vez, las enfermedades infecciosas son causadas por agentes patógenos específicos, tales como virus, bacterias, hongos, etc. (Blood y Radostits, 1992).

Los bovinos están expuestos a enfermedades infecciosas tales como mastitis, metritis, piometras, laminitis, dermatitis, brucelosis, diarrea viral bovina, complejo respiratorio bovino, leucosis bovina, rinotraqueítis infecciosa bovina, salmonelosis, tuberculosis, leptospirosis, campilobacteriosis, entre otras. Toda vez, que un animal contrae una enfermedad, sus mecanismos fisiológicos se ven afectados y como consecuencia el rendimiento productivo se deteriora notoriamente (Lüchter, 2004).

La aparición de enfermedades infecciosas en el ganado bovino lechero trae aparejado 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 su producción láctea. Por lo tanto, es importante analizar la frecuencia de enfermedades predominantes en el ganado vacuno productor de leche durante la lactancia.

Revisión Bibliográfica

En **Figura II.2** se observan las prevalencias de las enfermedades bovinas más comunes en los pequeños tambos, realizado por el Servicio de inspección de la salud animal del Departamento de agricultura de Estados Unidos durante el año 2007.

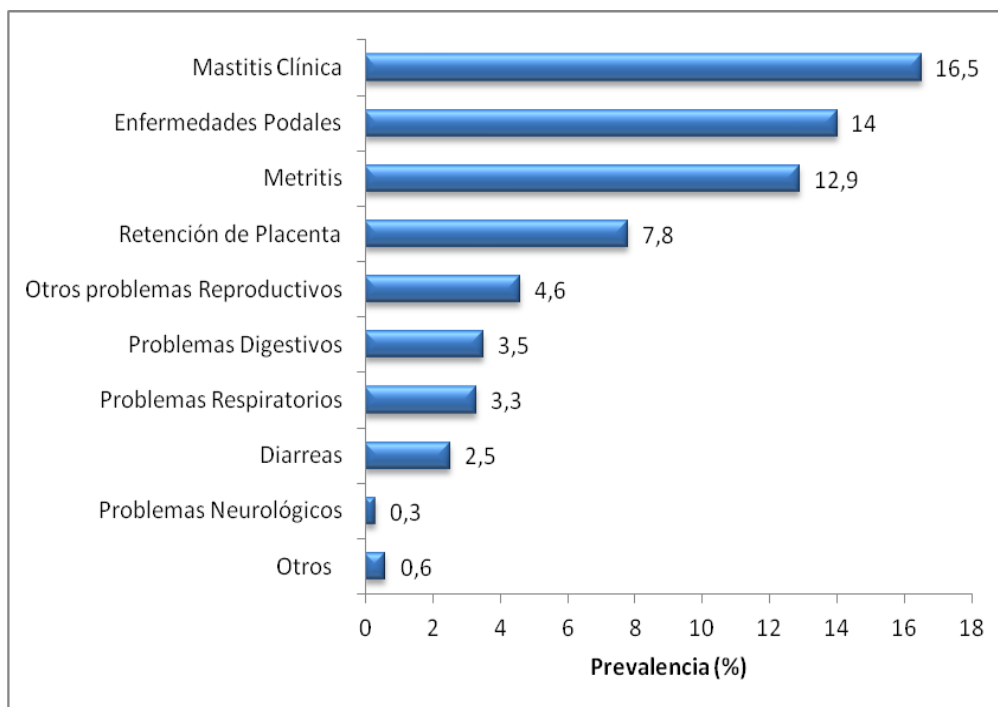


Figura II.2. Prevalencia de enfermedades en los establecimientos lecheros

Fuente: Servicio de inspección de la salud animal - Departamento de Agricultura USA (2007).

En el ganado vacuno productor de leche, las enfermedades que presentan una mayor incidencia son las mastitis (16,5%), la metritis (12,9%) y los problemas podales (14%), seguido de problemas de retención de placenta, problemas reproductivos y digestivos, diarreas, según se visualiza en **Figura II.2**. Trabajos previos realizados en los Estados Unidos también señalan que las enfermedades más frecuentes son mastitis clínica, cojera y metritis (Zwald *et al.*, 2004; Sawant *et al.*, 2005).

Revisión Bibliográfica

Similares prevalencias se reportaron en otros países tales como Alemania (Staerk *et al.*, 1997), España (Zorraquino *et al.*, 2007), Brasil (Segala y Silva, 2007), Suiza (Diserens *et al.*, 2010), Nicaragua (INTA, 2010) y Nueva Zelanda (Thompson *et al.*, 2012).

Sin embargo, estudios llevados a cabo por Larriestra y Vissio (2012) en la región centro de la provincia de Santa Fe (Argentina) informan que la prevalencia de mastitis subclínica representa el 19,4 % de los casos, mientras que solo un 3 % se deben a mastitis clínica. En forma similar a los valores presentados en la **Figura II.2**, Perusia (2001) informa un 16 % de enfermedades podales cuando realiza un relevamiento de las principales enfermedades en la cuenca centro santafesina de Argentina durante un período de seis años (1995-2001).

II.2.1. Mastitis

La mastitis bovina es la enfermedad que mayores pérdidas económicas causa al productor y a la industria láctea, ya que provoca disminución de la secreción láctea y deterioro de la calidad de la leche. La mastitis es la inflamación de la glándula mamaria provocada principalmente por bacterias que penetran a las partes más internas de la ubre afectando los alvéolos mamaros (Blood y Radostits, 1992). El factor de mayor incidencia en la aparición de esta enfermedad se debe a la mala higiene durante el ordeño (De vliegher *et al.*, 2012). Dicha infección en la glándula mamaria provoca una alteración en la composición de la leche, que puede variar de acuerdo al patógeno y a la intensidad de la infección (Oliveira, 2011).

Revisión Bibliográfica

La mastitis puede ser clasificada en clínica (confirmación por observación directa) y subclínica (no genera efectos detectables en el examen de rutina). Estas últimas pueden agudizarse por modificaciones en el ambiente como las precipitaciones y altas temperaturas (Phillips, 1996). A la mastitis se la considera como una enfermedad multietiológica, puesto que, actualmente se han logrado identificar más de 80 agentes etiológicos dentro de los que se encuentran especies de bacterias, hongos, micoplasmas y algas (Calvinho, 1999) siendo clasificados en microorganismos contagiosos y ambientales, según características epidemiológicas.

Los patógenos contagiosos viven y se multiplican en la glándula mamaria y piel del pezón, transmitiéndose de animal a animal durante el ordeño. Dentro de esta categoría de microorganismos se encuentran *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Carynebacterium bovis* (Calvinho, 2005), *Streptococcus dysgalactiae* y *Staphylococcus spp.* (Phillips, 1996). Los patógenos ambientales tienen su principal reservorio fuera de la glándula mamaria, formando un grupo heterogéneo donde las especies más frecuentes son *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus equinus*, *Streptococcus equi*, *Streptococcus parauberis*, *Escherichia spp.*, *Klebsiella spp.* y *Enterobacter spp.* (Phillips, 1996; Costa *et al.*, 1998; Lúchter, 2004; Calvinho y Tirante, 2005).

En un estudio realizado por Calvinho *et al.* (1991), sobre un total de 1150 muestras de leche de vacas provenientes de 39 tambos de la región centro santafesina, se destacó que las cepas que tenían un mayor porcentaje de aparición correspondían a *Staphylococcus aureus* (21,7%), seguido de *Streptococcus dysgalactiae* (5,9 %) y *Streptococcus agalactiae* (2,7 %), mientras que en menor proporción se aislaron cepas

Revisión Bibliográfica

de *Corynebacterium spp.* (13,9%), *Micrococcus spp.* (9,7%) y *Staphylococcus coagulasa negativos* (6,6 %). Por otra parte, un estudio llevado a cabo por Calvinho y Tirante (2005) en la misma región, encuentran 30,5 % de *Staphylococcus aureus*, 19,8 % de *Streptococcus dysgalactiae*, 10,0 % de *Streptococcus uberis*, 7,7 % de *Streptococcus agalactiae* y 7,1 % de microorganismos coliformes sobre un total de 238 aislamientos obtenidos a partir de mastitis clínicas.

Entre los principales factores de riesgo que predisponen a la mastitis se destaca una higiene inadecuada de las ubres pre y post ordeño, abundancia de precipitaciones y un medio ambiente caluroso, sucio y húmedo (Bradley *et al.*, 2002; Desmoures y Repetti, 2006).

Diferentes autores de diversos países, reportaron que las incidencias de mastitis clínica a microorganismos ambientales aumentan notoriamente en épocas del año calurosas y lluviosas (Olesen *et al.*, 1985; Smith y Hogan, 1993; Todhunter *et al.*, 1995; Supek, 1995; Miltenburg *et al.*, 1996; Elbers *et al.*, 1998; Waage *et al.*, 1998; Costa *et al.*, 1998; Andresen, 2001; Bradley *et al.*, 2002; México y Bernabucci *et al.*, 2002; Burvenich *et al.*, 2003; Gasqui *et al.*, 2003; Hogan y Smith, 2003; Seegers *et al.*, 2003; Robert *et al.*, 2005; Hospido y Sonesson, 2005; Desmoures y Repetti, 2006; Lacy-Hubert, 2006; Vasil, 2007; Calderón *et al.*, 2008; Pastor y Bedolla, 2008; Oliver *et al.*, 2011; Sharma *et al.*, 2011).

Si bien existe una gran variedad de medidas de control de la enfermedad, la terapia con antibióticos desempeña una práctica muy importante y ampliamente difundida para el control de la mastitis bovina. La mayoría de las drogas antimicrobianas utilizadas pertenecen a los betalactámicos, aminoglucósidos y

Revisión Bibliográfica

macrólidos (PROCALE, 1992; EMBRAPA, 1997). Además, con motivo de ampliar el espectro de formulación se utiliza neomicina asociada con antibióticos betalactámicos, macrólidos y lincosamidas (Hogan y Smith, 2003; Calvinho, 2007 y Oliver *et al.*, 2011).

II.2.2. Retenciones de placenta y metritis

La retención de membranas fetales se define como la no separación de las membranas fetales desde las carúnculas maternas dentro de las primeras 12 a 24 hs después del parto. Otra definición establece una distinción entre placenta demorada (placenta no expulsada entre 12 y 24 hs posparto) y placenta retenida (placenta no expulsada después de 24 hs del parto). La expulsión normal de las membranas fetales requiere que los tejidos maternos y los fetales experimenten un proceso de maduración y reblandecimiento, el cual se completa en promedio entre los 2 y 5 días antes de la gestación. Estos cambios incluyen colagenización del tejido conectivo, reducción del aporte sanguíneo, aparición de células gigantes polinucleares, reblandecimiento de los tejidos, y contracción de la musculatura uterina (Blood y Radostits, 1992; Rivera, *et al.* 2004).

La mayoría de las membranas fetales retenidas son expulsadas dentro de los 4 a 10 días posparto, luego que el tejido caruncular haya experimentado suficiente necrosis para que ocurra el fenómeno de separación (Dhaliwal *et al.*, 2001). En Argentina, la incidencia de retención de placenta se ubica dentro del 4 % al 11 % (Palmer, 2007).

Algunos de los factores de riesgo que llevan a la generación de esta patología son: distocia, duración gestacional anormal, estación del año calurosa o lluviosa, línea genética paterna y desbalances en la condición corporal al parto (Pugh *et al.*, 1994).

Revisión Bibliográfica

En caso que la retención de placenta no se trate a tiempo, puede llegar a infectarse y progresar a una metritis post parto. Por tanto, la terapéutica se debe enfocar principalmente a la prevención de la metritis (Cai *et al.*, 1994; Melendez *et al.*, 2004).

La metritis se define como una inflamación de las paredes musculares del útero y del endometrio. Dicha enfermedad afecta en forma negativa a la producción de leche y la reproducción de la vaca, además de aumentar la probabilidad de desarrollar numerosos desórdenes metabólicos que potencialmente comprometen la vida del animal (Belic *et al.*, 2012). La mayoría de los casos serios de metritis ocurren durante los primeros 10 a 14 días postparto (Blood y Radostits, 1992; Belic *et al.*, 2012).

El útero postparto es un buen ambiente para el crecimiento bacteriano, ya que es templado, lleno de líquido y contiene una cantidad variable de tejidos necróticos (Rivera *et al.*, 2004). Se han cultivado una gran variedad de bacterias procedentes del útero de vacas postparto, tales como *Escherichia coli*, *Pasteurella spp.*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Haemophilus somnus*, *Fusobacterium necrophorum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Prevotella melaninogenicus*, *Clostridium spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.* y *Manheimia hemolítica* (Overton *et al.*, 2003).

La metritis postparto usualmente se trata con antibióticos, hormonas o mediante una combinación de ambas. Los antibióticos indicados para estas afecciones son penicilina G con procaína o ceftiofur y se administran en forma parenteral o directamente dentro del lumen uterino. En animales con afecciones muy severas, deben emplearse agentes antiinflamatorios en fluidos intravenosos (Palmer, 2007).

*Revisión Bibliográfica**II.2.3. Enfermedades podales*

Las afecciones de las patas en las vacas lecheras constituyen una problemática de creciente importancia en el sistema extensivo pastoril de producción láctea. Los cambios tecnológicos que experimenta el sector lácteo en las últimas décadas aumentaron significativamente los factores de riesgo que desencadenan estas patologías. Brotes de rengueras y dificultad o incomodidad en el desplazamiento del rodeo son una preocupación frecuente y suponen un desafío para técnicos y productores lecheros (Ramos y Acuña, 2004).

Entre las afecciones podales que se presentan con mayor frecuencia se distinguen dermatitis digital, dermatitis interdigital, necrosis de talones, flemón coronario, úlcera plantar, pododermatitis purulenta circunscrita o difusa, laminitis aguda y crónica, callo interdigital, necrosis del flexor profundo, artritis y deformaciones de pezuñas (Murray *et al.*, 1996).

Un estudio realizado por Tadich *et al.* (2005) en el sur de Chile reporta una prevalencia de problemas podales del 9,1%. En **Figura II.3** se presenta las lesiones podales diagnosticadas por Tadich *et al.* (2005), donde se puede observar que las cuatro lesiones más frecuentes fueron deformaciones crónicas de la pezuña, lesiones de la línea blanca, lesiones de la muralla y doble suela.

Por otra parte, en un estudio realizado por Murray *et al.* (1996) en cuatro regiones de Inglaterra y Gales que comprende 8.645 lesiones asociadas con episodios de cojera, el 92% de las lesiones fueron en las extremidades posteriores, de las cuales el 65 % estaba en la pezuña externa, el 20 % en la piel y el 14 % en el casco interior. Además,

Revisión Bibliográfica

las úlceras solares (40 %) y las lesiones de la línea blanca (29 %) fueron las enfermedades predominantes del casco y dermatitis digital.

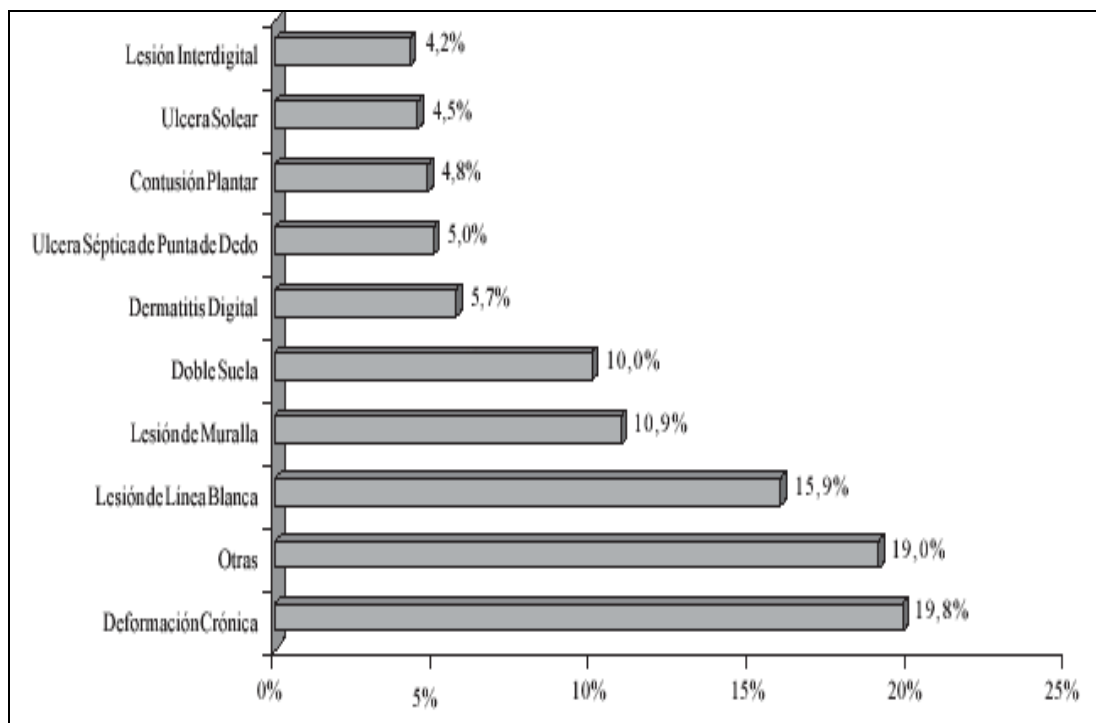


Figura II.3. Prevalencia de las lesiones podales en establecimientos lecheros
Fuente: Tadich *et al.* (2005).

En muchas de las afectaciones podales infecciosas antes mencionadas, se indica un correcto despezñado con aplicación de sulfato de cobre local y tratamiento antimicrobiano con oxitetraciclina o ceftiour. Además, los pediluvios que contengan lincomicina o tilosina se recomiendan con frecuencia para control poblacional en bovinos. (Murray *et al.*, 1996; Perusia, 2001; Scrollavezza *et al.*, 2002; Tomlinson, 2003; Ramos y González, 2004; Tadich *et al.*, 2005 y Philip *et al.*, 2011).

En un trabajo realizado por Villarroel *et al.* (2006), se observa que la aplicación de despezñado, aplicación local de sulfato de cobre y azul de metileno con o sin la

Revisión Bibliográfica

administración intramuscular de tilosina tienen gran efectividad en el control de las claudicaciones provocadas por problemas podales.

II.2.4. Otras enfermedades

Las enfermedades respiratorias representan el 4 % y 3,3 % de las afecciones del ganado lechero en Argentina (Perusia, 2001) y Estados Unidos (Guard, 1985; USDA, 2007), respectivamente. La enfermedad respiratoria de los bovinos se debe a un complejo de factores que interactúan para producir la enfermedad, tales como agentes infecciosos (virus y bacterias), ambiente en el que viven los animales y el manejo al que son sometidos. El stress producido por el manejo y el ambiente, con o sin la presencia de los virus, permiten la colonización de las bacterias en los pulmones con el posterior desarrollo de la enfermedad (Syvrud, 1988; Costa *et al.*, 2000; Casella, 2005). Entre los problemas respiratorios más comunes se encuentran la rinitis, traqueitis, bronquitis y neumonitis (Perusia, 2001, Lüchter, 2004).

Con respecto a las enfermedades digestivas más comunes en los bovinos de leche de alta producción se encuentran la acidosis ruminal aguda o subaguda, la cetosis y el desplazamiento abomasal (Ingvarsen *et al.*, 2003). La acidosis ruminal subaguda es una enfermedad común en vacas lecheras de alto rendimiento que reciben dietas de elevada digestibilidad. Esta enfermedad no solo afecta el consumo del alimento y la producción de leche, también puede desarrollar cuadros clínicos comprometiendo la salud del animal causando diarreas, laminitis, abscesos hepáticos y ruminitis crónica (Blood y Radostits, 1992; Salcedo *et al.*, 2012).

II.3. Uso de antibióticos

II.3.1. Concepto de antibióticos

Los antimicrobianos son sustancias que proceden de diferentes microorganismos o se sintetizan químicamente, con capacidad de inhibir o destruir los procesos vitales de las bacterias. El anuncio del primer antibiótico sulfamídico en el año 1935 inició la era moderna de la terapéutica antimicrobiana, caracterizada por una enorme disminución de la morbilidad y de la mortalidad para muchas enfermedades infecciosas (Cancho Grande *et al.*, 2000).

El uso terapéutico de los antibióticos en Medicina Veterinaria comenzó poco después de su aplicación en medicina humana y actualmente no se puede concebir a la práctica veterinaria moderna sin estas moléculas (Díez y Calderón, 1997). La gran variedad de antibióticos existente permite el tratamiento de las enfermedades infecciosas que afectan tanto a los animales de compañía como a los destinados a la producción de leche para el consumo humano (Mathew *et al.*, 2007).

La gran expansión e internalización de los microorganismos, unido a las resistencias que los agentes antimicrobianos producen a algunos de estos, constituye un serio problema que causa muertes e incremento del gasto médico, que aún hoy, no se ha podido cuantificar (Cancho Grande *et al.*, 2000; Landicho, 2002).

Desde hace varios años, se tienen en consideración las recomendaciones de la Unión Europea (UE) sobre el uso prudente de agentes antimicrobianos en medicina humana (CEE 82/2001), debido principalmente a la enorme preocupación generada por la aparición de resistencias antimicrobianas, lo que ha tenido consecuencias directas sobre el empleo de estas sustancias en sanidad animal.

Revisión Bibliográfica

De este modo, la prohibición paulatina por parte de la UE del uso de antibióticos como promotores del crecimiento ha supuesto ya un descenso importante en el uso de estos medicamentos veterinarios (Sarmah *et al.*, 2006).

II.3.2. Beneficios que producen los antibióticos en Medicina Veterinaria

El uso de compuestos antimicrobianos en la producción de alimentos de origen animal ofrece grandes beneficios demostrados, incluyendo mejor salud animal, mayor producción y, en algunos casos, reducción de patógenos transmitidos por alimentos (Mathew *et al.*, 2007). Es un hecho innegable que la utilización de estas sustancias en los actuales sistemas de producción animal representa una práctica necesaria 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 *et al.*, 2000; Schwarz *et al.*, 2001).

A diferencia de la medicina humana, el empleo de antibióticos en animales productores de alimentos tiene tres objetivos principales que, según Viola y DeVincent (2006) y Mathew *et al.* (2007) son:

- terapéutico para el tratamiento de animales enfermos;
- metafilaxis o de corto plazo de medicación, para el tratamiento de animales enfermos y prevenir la infección en otros animales,
- profiláctico, para prevenir infecciones en los momentos de riesgo, como el transporte o el destete.

El uso terapéutico de antibióticos permite el tratamiento de las enfermedades infecciosas que afectan a los animales y tiene por objetivo destruir los agentes

Revisión Bibliográfica

patógenos tan rápidamente como sea posible causando un mínimo de efectos adversos para el animal (Schwarza y Chaslus-Dancla, 2001), contribuyendo así a mantener el control de la sanidad del rodeo en el tambo (Mathew *et al.*, 2007). Los antimicrobianos logran controlar las enfermedades, que pueden constituir el 80% de los problemas en las unidades de producción agropecuarias intensivas (Sarmah *et al.*, 2006).

El tratamiento de las enfermedades infecciosas con niveles terapéuticos de antibióticos, también puede ser considerado desde una perspectiva humanitaria. Los animales que responden favorablemente al tratamiento por lo general sufren menos, y por menos tiempo, que aquellos que experimentan una recuperación sin ayuda o sucumben a la enfermedad (Gustafson y Bowen, 1997).

De acuerdo con el número de animales presentes y el tipo de producción, los tratamientos pueden ser individuales o grupales. En las grandes producciones, cuando un número limitado de animales han sido identificados como infectados, un rápido tratamiento de todos los animales del grupo resulta necesario para evitar la extensión de la infección. Esta acción se conoce como metafilaxis (Schwarza y Chaslus-Dancla, 2001).

Además de estas intervenciones, la profilaxis es una medida exclusivamente preventiva, tanto en forma individual como en grupos, durante circunstancias claves de la vida animal, como la cirugía, la vacunación, el transporte, la mezcla de animales y el fin de la lactancia de las vacas lecheras. Durante tales períodos, los animales son más susceptibles a las infecciones. Sin embargo, la aplicación profiláctica de antimicrobianos es cuestionada por su posible acción en la selección de bacterias

Revisión Bibliográfica

resistentes y la promoción de la propagación de genes de resistencia (Schwarz *et al.*, 2001).

II.3.3. Antibióticos más empleados en el tratamiento del ganado vacuno

Las enfermedades infecciosas del ganado vacuno que presentan mayor incidencia (mastitis, metritis, problemas podales, etc) fueron consideradas en el apartado **II.2**.

Para el tratamiento de dichas patologías es frecuente el uso de medicamentos veterinarios antimicrobianos, de modo que resulta interesante especificar los tipos de antimicrobianos recomendados en cada una de ellas, de acuerdo con el microorganismo causal, y las frecuencias de uso en los establecimientos lácteos, debido a que cuanto más se empleen estas sustancias durante los tratamientos, tanto mayor será el riesgo de encontrar sus residuos en la leche que se comercializa a la industria láctea.

II.3.3.1. Antibióticos utilizados para el tratamiento de mastitis

Algunos autores, tales como Zwald *et al.* (2004) y Sawnat *et al.* (2005), reportaron que el uso de antibióticos empleados en el tratamiento de las mastitis continúa siendo el principal motivo de una terapia antibiótica (hasta un 90% de los casos) y que las sustancias de elección en el caso de las mastitis clínicas en vacas en lactación son las penicilinas (penicilina G y amoxicilina), cefalosporinas (cefapirina y ceftiofur) y pirlimicina, mientras que en la terapia de secado (ampliamente difundida USA) es muy frecuente el uso de la novobiocina, además de cefapirina, penicilina G y cloxacilina, (Sawnat *et al.*, 2005).

Revisión Bibliográfica

En los países de la comunidad económica europea, los betalactámicos son los antibióticos más utilizados tanto en su forma parenteral como intramamaria. En España, un 77% de los preparados intramamarios para uso en lactación están compuestos por betalactámicos solos (38%) o a una combinación de éstos con otro grupo de antimicrobianos (39%). Mientras que, los preparados para el tratamiento de la mastitis en el período de secano, en su mayoría contienen betalactámicos, aminoglucósidos, tetraciclinas o macrólidos como principios activos (Zorraquino *et al.*, 2007).

En Reino Unido, los preparados de utilización intramamarias más comercializados contienen ácido clavulánico, amoxicilina, neomicina, penicilina, penetamato y estreptomicina (Diserens *et al.*, 2010). Así mismo, el 60 % de los tratamientos intramamarios utilizados en Suiza, contienen una combinación de penicilina y un aminoglucósido (gentamicina), y en menor medida utilizan cloxacilina, cefalosporina y la ampicilina (Diserens *et al.*, 2010).

En **Tabla II.4** se visualizan los porcentajes de utilización de antibióticos para el tratamiento de mastitis en USA (Zwald *et al.*, 2004), España (Zorraquino *et al.*, 2007) y Suiza (Diserens *et al.*, 2010). En dicha tabla se puede observar que los antibióticos utilizados preferentemente en estos países son los betalactámicos, con similitudes en sus frecuencias de uso. Mientras que en USA se utilizan en segundo lugar las tetraciclinas y las sulfamidas, en España y Suiza se emplean con mayor frecuencia los aminoglucósidos.

*Revisión Bibliográfica***Tabla II.4.** Porcentajes de utilización de antibióticos para tratamientos de mastitis

Antibióticos	USA	España	Suiza
Betalactámicos	61,6	54,19	61,51
Tetraciclinas	11,9	1,48	1,14
Sulfamidas	6,6	1,78	2,39
Macrólidos	5,3	3,15	4,77
Aminoglucósidos	13,2	30,93	21,58
Quinolonas	-	1,92	0,11
Otros	1,4	6,55	8,50

II.3.3.2. Antibióticos utilizados para el tratamiento de retenciones de placenta y metritis

Para el tratamiento de estas enfermedades se indican asociaciones de penicilinas, procaína o ceftiofur[®] siendo administrados parenteralmente o aplicados directamente dentro del lumen uterino (Palmer, 2007).

En España, los antibióticos utilizados con mayor frecuencia en los preparados farmacéuticos para el tratamiento de las metritis son la penicilina combinada con estreptomina (debido a su asociación sinérgica), seguido de amoxicilina, gentamicina, oxitetraciclina y trimetoprim asociado a sulfamidas (Zorraquino, 2008c).

En Estados Unidos, la utilización de ceftiofur[®], tetraciclinas, penicilinas y ampicilina se reportaron como tratamiento frecuente de retenciones de placentas y metritis en el 43 % de los establecimiento ganaderos (Zwald *et al.*, 2004).

En **Tabla II.5** se visualizan los porcentajes de uso de antibióticos para el tratamiento de retenciones de placenta y metritis en USA y España. Se observa que en USA, los betalactámicos se utilizan en un 79,3 %, seguido de un 12,4 % para las tetraciclinas y un 3,3 % para las sulfamidas (Zwald *et al.*, 2004). En España, los

Revisión Bibliográfica

antibióticos betalactámicos presentan un elevado porcentaje de uso (51,59 %) y en menor medida los aminoglucósidos (23,36%) y tetraciclinas (20,89 %), según los reportes de Zorraquino (2008c).

Tabla II.5. Porcentajes de utilización de antibióticos para tratamientos de retenciones de placenta y metritis

Antibióticos	USA	España
β lactámicos	79,3	51,59
Tetraciclinas	12,4	20,89
Sulfamidas	3,3	2,46
Aminoglucósidos	-	23,36
Quinolonas	-	0,76
Otros	5	0,94

II.3.3.3. Antibióticos utilizados para el tratamiento de enfermedades podales

El fármaco más difundido para las terapias de problemas podales en USA en 2005 fue la sulfadimetoxina con un 27,3 % (Sawnat *et al.*, 2005). Cabe aclarar que, aun cuando algunas sulfamidas no son eficaces contra anaerobios obligados, se las utiliza en los tratamientos de afecciones podales, debido a que pueden actuar contra los organismos aeróbicos que crean el microambiente adecuado para la proliferación del *Fusobacterium* (Sawnat *et al.*, 2005). Mientras que, en afecciones podales como la dermatitis digital la utilización del Ceftiofur[®] produce una curación en el 82 % de los casos a los treinta días posteriores al tratamiento parenteral, según Rutter *et al.* (2001).

Otro trabajo llevado a cabo en USA por Zwald *et al.* (2004) destaca que los antibióticos más utilizados para el tratamiento de las afecciones podales son los

Revisión Bibliográfica

antibióticos betalactámicos. Del mismo modo, Zorraquino (2008c) informa que los betalactámicos son las moléculas más empleadas en los tratamientos de enfermedades podales del ganado vacuno de España, seguidos por macrólidos, tetraciclinas, aminoglucósidos, sulfamidas y trimetoprim. Los porcentajes de uso en USA y España clasificados por cada familia de antibióticos se detallan en **Tabla II.6.**

Tabla II.6. Frecuencias porcentuales de utilización de antibióticos para tratamientos de enfermedades podales

Antibióticos	USA	España
β lactámicos	78,2	41
Tetraciclinas	18,7	12,2
Sulfamidas	3,1	3,3
Macrólidos	-	25,8
Aminoglucósidos	-	11,4
Quinolonas	-	1,5
Otros	-	4,8

II.3.3.4. Antibióticos utilizados en el tratamiento de otras enfermedades

Los problemas respiratorios y digestivos del ganado vacuno tienen una menor probabilidad de aparición y por lo tanto una menor relevancia en los establecimientos lecheros. Como consecuencia de ello, la utilización de antibióticos para el tratamiento de estas afecciones es menor en comparación con las cantidades de antibióticos utilizadas para el tratamiento de otras enfermedades del ganado vacuno, tales como la mastitis (USDA, 2007; Zorraquino, 2008c).

Revisión Bibliográfica

La **Tabla II.7** presenta las frecuencias de los antibióticos empleados en las enfermedades respiratorias en Estados Unidos (Zwald *et al.*, 2004) y España (Zorraquino, 2008c). Se puede observar que los antibióticos más utilizados para el tratamiento de estas patologías son los betalactámicos y las tetraciclinas. En menor medida, en USA se emplean las sulfamidas, mientras que en España se utilizan los aminoglucósidos y las quinolonas que prácticamente no se emplean en USA:

Por otra parte, un estudio realizado por Sawnat *et al.* (2005) señala que los antibióticos empleados en el tratamiento de afecciones digestivas son lincomicinas (86.7%) y tetraciclinas (13,3 %).

Tabla II.7. Porcentajes de utilización de antibióticos para tratamientos de enfermedades respiratorias

Antibióticos	USA	España
β lactamicos	65,1	31,6
Tetraciclinas	15,1	26,5
Sulfamidas	9,7	5,6
Macrólidos	1,4	6,5
Aminoglucósidos	-	10,2
Quinolonas	-	12,1
Otros	8,7	7,5

En un relevamiento realizado en España por medio de encuestas a veterinarios clínicos, Zorraquino (2008c) determinó que entre las enfermedades menos frecuentes, el 9 % correspondía a heridas producidas durante las operaciones quirúrgicas intraperitoneales de la vaca lechera en lactación, especialmente los desplazamientos de

Revisión Bibliográfica

abomaso y en menor grado las cesáreas. Para estos casos, en España los antibióticos más utilizados fueron betalactámicos (45,3 %), aminoglucósidos (40 %), tetraciclinas (9,6 %), quinolonas (3,7 %) y sulfamidas (0,4 %).

II.3.4. Efectos adversos de la presencia de ATBs en la leche

Los residuos de antimicrobianos en la leche ocasionan inconvenientes en los procesos industriales fermentativos (quesos y yogurt), en la salud de los consumidores (alergias y disbacteriosis digestiva) y en el medio ambiente; generando altos costos que los diferentes integrantes de la cadena productiva deben afrontar.

II.3.4.1. Problemas en los procesos industriales

En la industria láctea, la leche cruda de vaca se utiliza para la fabricación de leches de consumo en formas: pasteurizada, UHT, en polvo, concentrada, esterilizada, evaporada y condensada. Además, se emplea especialmente para la elaboración de productos lácteos fermentados como yogurt y quesos, entre otros (Berruga *et al.*, 2007, Packham *et al.*, 2001).

Desde el punto de vista tecnológico, la presencia de ATBs en leche destinada a la fabricación de los productos fermentados puede resultar perjudicial, puesto que muchos de los procesos bacterianos se ralentecen o incluso se inhiben completamente, dando como resultado importantes pérdidas económicas (Adetunji, 2011). En efecto, los productos fermentados utilizan bacterias, que son sensibles a los antibióticos, provocándoles cambios morfológicos y situaciones donde los cultivos iniciadores se

Revisión Bibliográfica

reemplazan por microorganismos indeseables, provocando la inutilización del producto, o un producto peligroso para su consumo humano (Packham *et al.*, 2001).

A su vez, la presencia de inhibidores repercute sobre la acidez y produce una mayor dificultad en el cuajado, obteniéndose quesos de menor calidad ya que el proceso de maduración se vería dificultado (Packham *et al.*, 2001; Adetunji, 2011). Además, cuando la leche que contiene residuos de ATBs se utiliza para la elaboración de quesos, pueden originarse defectos de sabor, textura y mal desarrollo (Goursand, 1991; Adetunji, 2011).

Dentro de la industria láctea *Streptococcus thermophilus* (ST) y *Lactobacillus bulgaricus* (LB) son microorganismos útiles que se emplean ampliamente para la fabricación de yogures y ciertos tipos de quesos. El ST es importante como productor de ácido, mientras que la mezcla ST-LB es necesaria para la obtención de una fermentación conveniente. Este equilibrio puede verse afectado por una temperatura de incubación no adecuada, la contaminación de bacterias y la presencia de inhibidores naturales o artificiales, tales como los antibióticos (Lozano y Arias, 2008). El desarrollo del ST en la fabricación de yogurt se dificulta con la presencia de concentraciones de 500-5.000 ppb de estreptomina, 50-100 ppb de clorafenicol, ó 1-10 ppb de tetraciclina (Del Prado, 1997).

Moretain (1996) observó que la elaboración de quesos se ve afectada por pequeñas concentraciones de antibióticos, debido a la modificación de su calidad. En el queso Edan, pequeñas concentraciones crecientes de penicilinas (0,005 UI/ml a 0,01 UI/ml) generan texturas irregulares y sabor amargo. Además, la leche conteniendo 1 UI/ml de espiramicina produce sabor a ácido butírico, acompañado de una fuerte

Revisión Bibliográfica

alteración en el gusto y distribución irregular de los ojos en el proceso de elaboración del queso Emmenthal (Mäyrä- Mäkinen, 1995).

Por su parte, los residuos de tetraciclinas en la leche pueden dar lugar a pérdidas económicas, puesto que inhiben los cultivos iniciadores de la fermentación y producen modificaciones de las características organolépticas de los productos como queso y yogurt (Perreten y Teuber, 1995; Packham *et al.*, 2001).

Por otra parte, la presencia de residuos de antibióticos en la leche sometida a un control de calidad bacteriológico, puede dar resultados erróneos, al enmascarse la presencia de gérmenes patógenos por el efecto inhibitorio de dichos residuos (Moretain, 1996).

II.3.4.2. Problemas económicos

Desde el punto de vista económico, la incidencia negativa originada por los antimicrobianos es muy significativa; ya que tan 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).

Se debe tener en cuenta además, que la presencia de residuos afecta también al propio tamero o productor, quién debe afrontar en forma responsable una penalización en el precio por parte de la industria láctea. En efecto, un tamero que entrega leche y contamina un camión cisterna es penalizado, en algunos casos, por la totalidad del contenido del camión, llegando inclusive a afrontar los costos económicos de la

Revisión Bibliográfica

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 según el análisis correspondiente, la presencia de residuos antimicrobianos en cantidades superiores a los máximos indicados en el artículo 556 del CAA.

En Argentina, la leche producida se encuentra afectada a un plan de muestreo y análisis de contaminantes que lleva a cabo SENASA bajo el nombre de Plan de control de Residuos e higiene en los Alimentos (CREHA) por el cual se monitorea la calidad de la leche cruda que ingresa a las plantas transformadoras.

II.3.4.3. Problemas medioambientales

Se debe considerar que una cantidad importante de los ATBs recibidos originalmente por los animales no se metabolizan y se eliminan por leche, orina y/o heces (Kemper, 2008) pudiendo llegar a contaminar la capa superior del suelo, donde se pueden acumular o bien pueden filtrarse a las aguas subterráneas (Martinez-Carballo *et al.*, 2007). Además, la estructura química de los ATBs determina una mayor o menor estabilidad en el medio ambiente de estas sustancias. Por ejemplo, el carácter policatiónico de los aminoglucósidos, les permite ser muy solubles en agua y altamente estable en el medio ambiente (Mella *et al.*, 2004). Asimismo, se han encontrado residuos de macrólidos, tetraciclinas, sulfonamidas, lincosamidas, trimetoprim,

Revisión Bibliográfica

fluoroquinolonas y en escasas ocasiones betalactámicos, en las aguas superficiales y efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales (Blackwell *et al.*, 2007).

Por lo general, no se espera encontrar residuos de antibióticos betalactámicos (penicilinas y cefalosporinas) y tetraciclinas en el medio acuático, debido a la fácil hidrólisis de las penicilinas y la precipitación de las tetraciclinas. Las tetraciclinas no se han detectado, debido a su fuerte absorción a la materia orgánica, sin embargo Kemper (2008) aisló bacterias resistentes a la tetraciclina en aguas de lagunas y aguas subterráneas que subyacen a dos centros de producción porcina que utilizan tetraciclinas para el tratamiento de las enfermedades de los cerdos.

Según un estudio realizado por Blackwell *et al.* (2007) la oxitetraciclina presentó bajo riesgo de contaminación del suelos y las aguas superficiales, pero un elevado potencial de persistencia en el suelo; mientras que, las sulfamidas mostraron un riesgo moderado de contaminación de las aguas subterráneas o superficiales, con poco potencial para acumularse en los suelos.

II.3.4.4. Problemas sobre la salud del consumidor

La presencia de ATBs en los productos destinados al consumo, puede ocasionar diversos problemas; ya que algunas de estas sustancias no se destruyen con los tratamientos térmicos aplicados en la industria tales como en la pasteurización y la esterilización (Zorraquino *et al.*, 2008a,b, 2009, 2011, Roca *et al.* 2010, 2011, 2013, Adetunji, 2011), por lo que pueden llegar al consumidor aún después de haber sido sometidas a dichos tratamientos. En particular, se ha comprobado que algunas de las sustancias farmacológicas presentes en la leche, tales como las quinolonas resisten las

Revisión Bibliográfica

altas temperaturas (Zorraquino *et al.*, 2005, Roca *et al.*, 2010), esto intensifica la importancia del problema de la presencia en la leche de estas sustancias, para la salud pública (Packham *et al.*, 2001; Berruga *et al.*, 2007; Bradley y Green, 2009).

Por su parte, según Lyn *et al.* (1992), los antibióticos betalactámicos pueden ocasionar inconvenientes, tales como reacciones de hipersensibilidad (exantemas, edemas, hemólisis, hemocitopenias y excepcionalmente accidentes graves como el shock anafiláctico. Estos cuadros clínicos pueden presentarse con frecuencias comprendidas entre el 5% y el 10% de la población, que es extremadamente sensible a dosis de 1 µg/l de penicilina u otros betalactámicos (Khaskheli *et al.*, 2008). Además, se ha señalado hipersensibilidad cruzada entre los betalactámicos. Como por ejemplo el caso de penicilinas con carbapenemas y penicilinas con cefalosporinas (Marín y Gudiol, 2003).

Debido a su baja toxicidad, los macrólidos (eritromicina y oleandomicina) se utilizan con mucha frecuencia en formulaciones veterinarias, y sus residuos suelen encontrarse en carne, hígado, riñón, leche y huevos (Edder *et al.*, 2002), incrementándose el riesgo potencial para la salud de los consumidores, ya que pueden producir reacciones alérgicas y sensibilidad (Horie, 1995; Wang y Leung, 2007). Además, estos antibióticos pueden desarrollar antibioresistencia. En efecto, el uso masivo de macrólidos fue la principal causa de diseminación de resistencia entre agentes causales de infecciones tales como *Staphylococcus* spp. y miembros de la familia Enterobacteriaceae (Mulazimoglu *et al.*, 2005).

En cuanto a los aminoglucósidos, debido a su alta solubilidad y su reducido transporte a la glándula mamaria, se eliminan en forma limitada por leche cuando se

Revisión Bibliográfica

administran en forma parenteral, sin embargo cuando se administran en forma intramamaria se pueden encontrar altas concentraciones en la leche (Gilbert, 2000). Dentro de los efectos adversos de estas sustancias se destacan las lesiones tóxicas en los oídos (ototoxicidad) y en los riñones (nefrotoxicidad) según Sarmah *et al.* (2006).

Entre las lincosamidas utilizadas para el tratamiento de mastitis clínicas y subclínicas del ganado bovino, ovino y caprino se destacan lincomicina y pirlimicina (Brugueras y García, 1998). Cuando estos antibióticos se administran por vía intramuscular, alcanzan elevada concentración hemática a los diez minutos luego a la inyección. Se eliminan por vía biliar, aunque también lo hacen por riñón, materia fecal y leche (Ruiz y Moreno, 2005; Rubio y Boggio, 2009). En los consumidores podrían provocar perturbaciones pasajeras en la flora intestinal (Khan *et al.*, 2000).

Con respecto a las quinolonas, cabe destacar que Acar y Goldstein (1997) y Stein y Havlichek (1998) han reportado numerosos casos de resistencias a estas moléculas, tanto por parte de bacterias gram positivas (*Staphylococcus aureus*) como gram negativas (*Pseudomona aeruginosa*). Estos autores la atribuyen a las alteraciones en los estados enzimáticos de las quinolonas (ADN girasa), la disminución de la permeabilidad de la membrana externa o al desarrollo de mecanismos de eflujo. Debido a que numerosos microorganismos son resistentes a estas moléculas, resulta importante controlar la presencia de residuos de quinolonas en la leche para evitar su llegada al consumidor.

Se ha reportado que aproximadamente el 5% de pacientes humanos tratados con las sulfamidas, desarrollaron efectos indeseados como reacciones alérgicas o tóxicas (Montanaro *et al.*, 1998), trastornos gastrointestinales y reacciones hematológicas

Revisión Bibliográfica

(Adams, 2003). Entre los problemas que pueden ocasionar los residuos de sulfamidas sobre la salud del consumidor, se destaca su potencial actividad carcinogénica, de gran importancia en la seguridad alimentaria. A modo de ejemplo, Littlefield (1990) destaca la actividad carcinogénica de algunos residuos de sulfamidas (sulfametazina) en leche.

Por último, los residuos de tetraciclinas al igual que otros antibióticos, pueden causar dificultades asociadas con síntomas de alergia y el desarrollo de resistencia de los microorganismos en los seres humanos (McManus, 1997; Demoly y Romano, 2005). Además, los residuos de ATBs podrían provocar perturbaciones pasajeras en la flora intestinal del consumidor (Khan *et al.*, 2000) y pueden ser la causa de colonización intestinal de bacterias patógenas u oportunistas (Giraffa, 2004).

II.3.5. Aspectos legales sobre los residuos de ATBs en la leche a nivel mundial

Se entiende por residuos de medicamentos veterinarios a “*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*”.

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

Revisión Bibliográfica

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

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

Estos límites están legislados por la Comisión Reguladora de la CEE (CEE 37/2010). El **Tabla II.8** muestra los LMRs establecidos por el Codex Alimentarius, la Unión Europea y niveles de tolerancia en USA para diferentes antimicrobianos en leche.

Para los países miembros de la CEE, mediante la Directiva CEE/82/2001 se crea un Comité de medicamentos veterinarios que facilita la adopción por parte de los Estados miembros de decisiones comunes sobre autorización de medicamentos veterinarios basándose en los criterios científicos de calidad, seguridad y eficacia, y conseguir así la libre circulación de medicamentos veterinarios en la UE.

Revisión Bibliográfica

Tabla II.8. Límites máximos de residuos (LMRs) establecidos por el Codex Alimentarius, Unión Europea y tolerancia en USA de antimicrobianos en leche

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

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

Revisión Bibliográfica

En nuestro país, según el artículo 556, Capítulo VIII del Código Alimentario Argentino (CAA), se considera leche no apta para ser consumida como tal o para ser destinada a la elaboración de leches y productos lácteos, a aquella leche que verifique la presencia de residuos tales como antimicrobianos, antiparasitarios, sustancias químicas, pesticidas, sustancias tóxicas y/o contaminantes.

II.3.5.1. Reglamentación 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) 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 (**Tabla II.8**) que puede estar presente en la leche. Dichos valores fueron aprobados por la Comisión del Codex Alimentario en su décimo séptimo período de sesión.

El SENASA, por medio de la Resolución N° 256/2003, adoptó los LMRs establecidos por el CODEX (CODEX, 1996, 2007), aunque se debe destacar que, en

Revisión Bibliográfica

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.

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 Cap. IX del Dec. 4238/68 - Resolución 290. Este plan prioriza los residuos químicos, aditivos, toxinas y microorganismos que se controlarán mediante un programa anual. Además determina aquellos que constituyen un mayor riesgo para la salud pública, cumpliendo de esta manera con las exigencias y los Límites Máximos Admitidos, según las legislaciones y normas nacionales e internacionales vigentes.

Por su parte, SENASA exige análisis para la detección de antibióticos, tetraciclinas, cloranfenicol, sulfonamidas, ivermectina, albendazol, plomo, cadmio, arsénico, mercurio, aflatoxinas, clorados y fosforados. Los muestreos se deben realizar cada dos meses, o bien 1 o 2 veces al año, según la cantidad de litros anuales que se procesen (nivel de producción I, II, III). Los resultados deben ser inferiores a los LMRs que establece el CODEX y los métodos analíticos recomendados para analizar las muestras de leche son la cromatografía en capa fina, HPLC, electroforesis, ELISA, bioensayos, métodos microbiológicos, entre otros (SENASA, 1999, 2000, 2001, 2003). 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 receptor microbiano (CAA, 2011).

*Revisión Bibliográfica**II.3.6. Métodos utilizados para la detección de antibióticos en la leche*

Los primeros métodos utilizados para la detección de residuos de antibióticos en la leche se empezaron a difundir 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 conoce como métodos de inhibición microbiológica (Bishop y White, 1984).

Desde entonces, las diferentes casas fabricantes han mejorado las propiedades de estos métodos, tales como: rapidez de la respuesta, exactitud, sencillez, fecha de caducidad, especificidad y capacidades de detección para una mayor número de moléculas de antibióticos.

No obstante, hasta el momento no se dispone de métodos que permitan detectar la totalidad de los antimicrobianos utilizados a niveles equivalentes a los correspondientes LMRs, por ello, algunos autores proponen el empleo de dos o más bacteria-test para lograr una detección más amplia de moléculas antimicrobianas (Nagel *et al.*, 2011b).

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

Revisión Bibliográfica

métodos de confirmación proporcionan una información que permite identificar y cuantificar de manera inequívoca la sustancia específica a nivel de interés.

Para el caso concreto de la leche, los métodos de cribado utilizados en forma más frecuente son los métodos microbiológicos (Delvotest[®], BRT[®] AiM, Charm[®] Blue-Yellow, Eclipse[®] 100 ov), enzimáticos (Penzym[®]) y de receptores proteicos (SNAP[®] Combo, Twinsensor[®], ROSA Charm[®], etc.).

Los principios de funcionamiento de los métodos microbiológicos 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 *et al.*, 2009).

Entre las propiedades más relevantes de estos métodos, se destaca el límite de detección, o la capacidad de detección (CC β) 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 β . 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 $1 - \beta$ ”*.

Revisión Bibliográfica

Por ello, en la **Tabla II.9** 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 *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, a excepción del Bieonsayo ResScreen BT que contiene cloranfenicol en el medio de cultivo (Nagel *et al.*, 2011b). 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 otros agentes antimicrobianos, los niveles de detección de eritromicina, tilosina, tilmicosina y neomicina son próximos a sus LMRs, mientras que los residuos de quinolonas no llegan a ser detectados por estos métodos puesto que *Geobacillus stearothermophilus* no es sensible a esta familia de antibióticos.

El método microbiológico ResScreen[®] presenta límites de detección similares a los LMRs en las familias de antibióticos betalactámicos, tetraciclinas y sulfamidas. A su vez, al ser un método de fabricación Argentina, facilita la accesibilidad del mismo (Nagel *et al.*, 20011a, 2012a, 2012b).

A continuación, se muestra un relevamiento de la detección de la presencia de inhibidores en la leche determinados en diferentes países del mundo empleando distintos métodos microbiológicos de similares características a los detallados anteriormente.

Revisión Bibliográfica

Tabla II.9. Límites de detección ($\mu\text{g}/\text{kg}$) de diferentes métodos de inhibición microbiológica

Antibiótico	LMR	Delvotest SP-NT	BRT MRL	Eclipse	Charm Blue- Yellow	ResScreen	
						BT	BS
Betalactámicos							
Benzilpenicilina	4	1-2	1,5-2	4	3-4	3	3
Ampicilina	4	4	2-3	5	5	7	4
Amoxicilina	4	2-3	2-3	5	5-6	8	5
Oxacilina	30	10	5-10	25	-	17	16
Cloxacilina	30	20	10-20	40	30-50	42	40
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	105	115
Cefoperazona	50	-	20-30	-	-	62	94
Cefalexina	100	-	100-200	75	-	99	160
Cefalonio	20	-	10-15	-	-	-	-
Cefazolina	50	-	10-25	-	-	-	-
Cefquinoma	20	-	80-100	-	-	-	-
Cefacetilo	125	-	-	-	-	-	-
Tetraciclinas							
Tetraciclina	100	250-500	100-200	150	-	158	720
Oxitetraciclina	100	250-500	250-500	150	300	150	850
Clortetraciclina	100	-	-	-	-	275	3600
Sulfamidas							
Sulfametazina	100	25-100	100-300	200	-	30000	610
Sulfadimetoxina	100	-	100	-	50	12000	260
Sulfatiazol	100	-	100	75	-	13000	100
Sulfadiazina	100	25-50	100	-	-	49000	164
Macrólidos							
Eritromicina	40	40-80	40-60	300	-	210	190
Espiramicina	200	400-600	200-400	1000	-	3400	2600
Tilmicosina	50	-	-	-	-	-	-
Tilosina	50	30	25-50	80	75-100	74	50
Aminoglucósidos							
Gentamicina	100	50	100-200	500	300-400	320	530
Neomicina	1500	100-200	500-750	1500	-	600	1200
Kanamicina	150	-	-	6000	-	5600	6200
DH/Estreptomicina	200	-	400-600	2500	-	2300	3600
Quinolonas							
Enrofloxacina	100	-	-	-	-	2000	2300
Flumequina	50	-	-	-	-	-	-

Fuente: Nagel, *et al.* 2011b

*Revisión Bibliográfica**II.3.7. Frecuencia de la presencia de inhibidores y antibióticos en la leche*

La aplicación de tratamientos farmacológicos, según la composición intrínseca del fármaco, excipiente, dosis y vía de administración; generan residuos (sustancia original y/o metabolitos) que son excretados a través de los fluidos o secreciones corporales como la orina y la leche (Pascal Sanders, 2005; Sawant *et al.*, 2005), o acumulados en tejidos (Kang'ethe *et al.*, 2005; Adesiyun *et al.*, 2007). Dichos residuos pueden persistir durante un mayor o menor tiempo, tanto en los animales tratados como en los productos elaborados (Debackere, 1995; Pascal Sanders, 2005).

El origen de la contaminación de la leche cruda con residuos de medicamentos veterinarios, especialmente con ATBs, tiene lugar en el establecimiento agropecuario, como consecuencia de los tratamientos terapéuticos veterinarios que se aplican a las vacas lecheras en lactación o en el período de secano y del incumplimiento de los períodos de seguridad de los medicamentos recomendados por las casa fabricantes. Dichos residuos aparecen en la leche con mayor frecuencia si se los compara con otros tipos de xenobióticos (Zwald *et al.*, 2004).

Para el ganado productor de leche, se utilizan principalmente tratamientos curativos aplicados a los animales que padecen infecciones microbianas en la ubre, o bien tratamientos de tipo preventivos que se realizan en el momento del secado, para evitar la aparición de dichas patologías en la lactación siguiente (Van Eenennaam *et al.*, 1993; Sawant *et al.*, 2005; Adesiyun *et al.*, 2007). Dichos tratamientos son aplicados por vía intramamaria, por ser el tejido secretor de la glándula mamaria el objetivo de acción de las sustancias antiinfecciosas que contienen normalmente un antibiótico. Con los tratamientos intramamarios a la vez que se consigue una mayor eficacia terapéutica

Revisión Bibliográfica

por su acción local, también se produce una mayor excreción del antibiótico en la leche, siendo esta vía de administración la que origina residuos con mayor frecuencia (Zwald *et al.*, 2004; Adesiyun *et al.*, 2007).

En **Tabla II.10** se muestran las incidencias de residuos de antibióticos en leche bovina en diferentes países de Europa y América, llevados a cabo entre los años 1960 y 2010, junto a sus respectivas referencias bibliográficas.

La incidencia de residuos de antibióticos en la leche ha disminuido en los últimos años, debido fundamentalmente a la implementación de las buenas prácticas ganaderas y a un mayor control mediante el uso de métodos de cribado (Zorraquino *et al.*, 2007).

En dicha tabla se aprecia que hace 40 años la presencia de antibióticos en leche se ubicaba alrededor del 11 % de las muestras analizadas en el Reino Unido, mientras que estas cifras se han reducido significativamente a valores cercanos al 0,4 % desde 1985 (Booth y Harding, 1986). Estos resultados son similares a los señalados en Estados Unidos con frecuencias que disminuyeron desde el 5,2 % y un 6 % (1960) hasta un 0,04% (2004).

En lugares como Kenia y el Caribe, los niveles de residuos de antibióticos son elevados debido a que todavía no existe una legislación que regularice su control (Baynes *et al.*, 1999; Shitandi y Sternejo, 2004).

Tabla II.10. Evolución de la presencia de antibióticos en leche en diferentes países

Lugar	Periodo	Incidencia	Referencia
<i>Europa</i>			
Alemania	1993	2,8%	Suhren y Heesch (1994)
	1998/02	0,23-0,31%	Suhren y Walte (2003)
Bavaria	2005	0,04%	Kress et. al. (2007)
Bélgica	2003	0,11%	FAVV (2003) (a)
Eslovaquia	2012	0,087 %	Zajac et. al. (2012)
España	1977	32,62 %	Pozo Lora, et. al. (1977)
Andalucía	2000	0,18%	Sánchez et. al. (2001) (a)
Holanda	2004	0,04%	MCS (2004) (a)
Italia (Brescia)	2001	0,34%	Ghidini et. al. (2003)
Portugal (Lisboa*)	1996	44%	Marques-Fontes et. al. (1996) (a)
Reino Unido	1960	5%	Seymour et. al. (1988)
	1961	11,1%	Booth y Harding (1986)
	1984/85	0,4%	Booth y Harding (1986)
Suecia	1996	1,8 %	Mellgren et. al., (1996)
Turquía	2003/04	1.25%	Kaya y Filazi (2010)
<i>América</i>			
Barbados	1999	8 %	Baynes et. al. (1999); Faria Reyes, (2002)
Brasil	2005/06	41,3%	Bando et al. (2009)
	2009	0 %	Oliveira et al. (2011)
Caribe	1999	8-15%	Baynes et. al. (1999)
Costa Rica	1999	0 %	Baynes et. al. (1999); Faria Reyes, (2002)
Cuba	1986	17,5%	Pozo, E. et. al. (1986)
	1987	36,11%	Pozo, E. et. al. (1987)
USA	1952	7 %	Kosikowsky et al, (1952)
	1960	5,2-6%	Albright et.al.(1961); Seymour et.al.(1988)
Virginia	1975	7-15%	Jones y Seymour (1988)
	1988	0,06-0,2%	Jones y Seymour (1988)
	1994	0,05-0,06%	Sischo (1997); Saville et. al. (2000)
	1995	0,1%	Anderson et. al. (1998); Dalton (2006)
Wisconsin	1997	0,1%	Saville et. al. (2000)
New York	1995/98	0,03%	Ruegg y Tabone (2000)
	1999/00	0,039%	Van Schaik et. al. (2002)
	2003	0,053%	FDA (2003) (a)
	2004	0,044%	Dalton (2006)
Jamaica	1999	10 %	Baynes (1999); Faria Reyes, (2002)
México	1986	90,4 %	Camacho Díaz et. al. (2010)
Jalisco	1999	12 %	Camacho Díaz et. al. (2010)
	2005	51,2 %	Camacho Díaz et. al. (2010)
Jalisco	2009	9,8 %	Noa-Lima et. al. (2009)
T. Caliente	2010	18,60 %	Camacho Díaz et. al. (2010)
Perú*	1988	25,75%	Camacho Díaz et. al. (2010)
	2002	20,83 %	Llanos Cortesana (2002)
	2007	16,1 %	Ortiz et al. (2008)
Venezuela	1994	20,34 %	Rivero et. al. (1994)
	2002	23 %	Faria Reyes, (2002)

(a) Fuente: Zorraquino Lozano; 2007 * leches comerciales analizadas.

Revisión Bibliográfica

La información sobre la clasificación de los inhibidores en leche es limitada, sin embargo, algunos de los trabajos incluidos en la **Tabla II.10**, señalan que un alto porcentaje de los residuos corresponden a sustancias del grupo de los betalactámicos (Zorraquino *et al.* 2007; Kress *et al.*, 2007). Hecho que es bastante razonable si se considera que, a pesar de ser los antibióticos más antiguos, estos ATBs continúan siendo el grupo más utilizado para el tratamiento de la mastitis, además de disponerse de una mayor cantidad de preparaciones comerciales (Kress *et al.*, 2007). También se debe tener en cuenta que la mayoría de los métodos de screening detectan moléculas pertenecientes a esta familia, entre los cuales se destacan los métodos microbiológicos que utilizan *Geobacillus stearothermophilus*, con elevada sensibilidad para betalactámicos (Linage *et al.*, 2007; Montero *et al.*, 2005; Althaus *et al.*, 2009).

Los preparados farmacológicos para tratar las mastitis utilizan combinación de diferentes antibióticos, aumentando la frecuencia de muestras con residuos de varios tipos de ATBs (Sawant *et al.*, 2005). Así, Ortiz *et al.* (2008) encontraron un 16,1% de residuos de antibióticos en leche en camiones cisternas de Arequipa (Perú), la cual estaba constituida por 34,3 % de betalactámicos, 54,5% de una combinación de betalactámicos y tetraciclina, 7,1% de tetraciclinas y 4,1% de otros antibióticos. El elevado porcentaje de residuos de betalactámicos (88,8%) tiene relación con el uso continuo, y muchas veces excesivo, de estas sustancias en la ganadería lechera, que ha ido incrementando la incidencia de cepas de bacterias resistentes (Mathew *et al.*, 2007; Ortiz *et al.*, 2008), propiciando la utilización de otros antibióticos, principalmente las tetraciclinas (Sawant *et al.*, 2005; Ortiz *et al.*, 2008).

Revisión Bibliográfica

Por último, un estudio realizado por Bando *et al.* (2009) se analizaron 151 muestras de leche pasteurizada comercializadas en el Estado de Paraná (Brasil), encontrándose cuarenta y nueve (41,3 %) con residuos de antibióticos. Del total de muestras positivas el 83,7% de los casos positivos pertenecen a residuos de tetraciclinas, seguidas de un 10,2% de betalactámicos. Guerrero *et al.* (2009), en un estudio llevado a cabo en Callao (Perú), detectaron residuos de antibióticos betalactámicos en el 40% del total de las muestras de leche cruda analizadas.

Se debe destacar que en Argentina y concretamente en la cuenca centro santafesina productora de leche, prácticamente no se han encontrado estudios de relevamiento de inhibidores en la leche, así como tampoco análisis de la naturaleza de estos residuos.

III. OBJETIVOS

La presente Tesis persigue como objetivo general evaluar la presencia de residuos de antibióticos en la leche de los pequeños tambos de la región centro de Santa Fe. Para su logro, se han previsto los siguientes objetivos específicos:

- Determinar la frecuencia de aparición de residuos de antibióticos en muestras de leche de estos pequeños tambos e identificar su naturaleza (betalactámicos, tetraciclinas o sulfamidas) empleando el bioensayo ResScreen[®] BT y BS
- Llevar a cabo un estudio de tipo longitudinal, que permita identificar aquellos períodos del año donde se incrementa la frecuencia de resultados positivos y utilizar esta información para implementar futuros planes de control y prevención de residuos de ATBs en la leche.
- Evaluar el efecto de variables asociadas con la calidad higiénico-sanitaria, tales como los recuentos de células somáticas y los recuentos de gérmenes, sobre la presencia de resultados positivos a fin de poder utilizar dicha información, como un instrumento para prevenir y disminuir estos resultados.
- Evaluar el efecto de variables asociadas con los factores ambientales, tales como la temperatura ambiente y las precipitaciones, sobre la presencia de estos resultados positivos a los test de inhibición microbiológica.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1. Relevamiento de la presencia de residuos de ATBs en pequeños tambos de la zona centro de Santa Fe

Para la realización del presente estudio se llevó a cabo un enfoque metodológico de tipo longitudinal, observacional y descriptivo durante el año 2010. Para ello se analizaron muestras de leche de tanque procedentes de tambos que entregan leche a las pequeñas empresas lácteas de la región centro de Santa Fe que efectúan sus controles de composición química en forma periódica en el laboratorio lactológico LaRSA (Laboratorio Regional de Servicios Analíticos) dependiente de ALECOL (Asociación del Litoral de Entidades de Control Lechero).

IV.1.1. Toma de las muestras de leche

Para la toma de muestra se siguieron los procedimientos de rutina establecidos por el laboratorio LaRSA dependiente de ALECOL. Para ello, las muestras de leche se obtuvieron en forma individual de cada tambo, luego de verificar que el equipo agitador del tanque haya estado encendido al menos por 15 minutos antes del muestreo. Las alícuotas de leche (40 ml) se transportaron al laboratorio en forma refrigeradas, a una temperatura comprendida entre 0 y 4 °C en conservadoras conteniendo refrigerantes congelados. Estas muestras fueron obtenidas sin la adición de conservantes para evitar que los inhibidores puedan interferir con las respuesta de los métodos microbiológicos, evitando de este modo la posible aparición de resultados “falsos positivos”.

Materiales y Métodos

La distribución de frecuencias de muestras analizadas se presenta en Figura V.1. Las frecuencias mensuales de muestras de leche estuvieron comprendidas entre 170 y 380, correspondiente a los meses de marzo y diciembre, respectivamente. En total se analizaron 3300 muestras de leche.

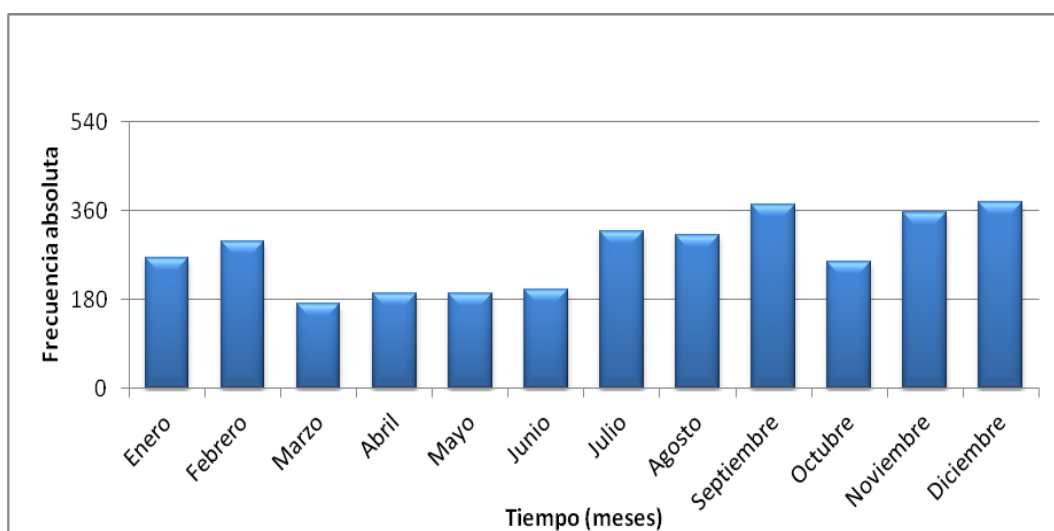


Figura IV.1. Frecuencias absolutas de las muestras de leche bovina analizadas por el sistema ResScreen[®] en el año 2010.

IV.1.2. Análisis de antibióticos en la leche mediante el Sistema ResScreen[®]

Cada muestra de leche se analizó por triplicado en forma simultánea por los bioensayos ResScreen[®] BT (específico para betalactámicos y tetraciclinas) y ResScreen[®] BS (específico para betalactámicos y sulfamidas).

El sistema ResScreen[®] se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Por lo tanto, 50 µl de muestra de leche se añadió a las placas individuales de la "BT" y "BS" del sistema ResScreen[®]. Las placas se incubaron en un baño de agua a 64 ± 1 °C durante tiempos aproximados de 3 h ("BT" ResScreen[®]) y 4 h ("BS"

Materiales y Métodos

ResScreen[®]), hasta producirse el cambio de color de las muestras controles negativas de cada microplaca.

Los resultados se interpretaron visualmente por tres profesionales entrenados para la interpretación de respuestas de tipo dicotómicas (positivo o negativo) según el cambio de color en los indicadores. Se consideró como resultado aquel que produjo al menos dos respuestas iguales por los analistas.

IV.1.3. Fundamentos del Sistema ResScreen[®]

El sistema ResScreen[®] consta de dos bioensayos que contienen esporas de *Geobacillus stearothermophilus* subsp. *calidolactis* C-953. El método microbiológico se basa en la inhibición del crecimiento de la bacteria-test cuando la leche contiene residuos de antibióticos. La combinación de bioensayo BT (betalactámicos y tetraciclinas) y bioensayo BS (betalactámicos y sulfamidas) ha sido optimizada para la detección e identificación de residuos de antibióticos betalactámicos (Nagel *et al.*, 2012a), tetraciclinas (Nagel *et al.*, 2011a) y sulfamidas (Nagel *et al.*, 2012b) en la leche. Esta ventaja adicional de poder identificar tres familias de antimicrobianos se logra empleando ambos métodos en forma simultánea (Nagel *et al.*, 2011b).

El principio del método se basa en la inhibición del crecimiento de *G. stearothermophilus* cuando la leche contiene residuos de antimicrobianos. En el caso que la leche esté libre de antimicrobianos, se producirá el crecimiento del microorganismo, acompañado de un cambio en la coloración de los indicadores de los bioensayos BT (de púrpura a amarillo) y bioensayos BS (de negro a amarillo). Por el

Materiales y Métodos

contrario, la presencia de ciertos antibióticos no producirá cambios en algunos de los colores originales de los bioensayos.

En caso que se desee investigar la naturaleza del antibiótico presente en una muestra de leche incógnita, se procederá al análisis mediante ambos bioensayos, la interpretación se efectúa según Tabla IV.1 (Nagel *et al.*, 2011b).

Tabla IV.1. Interpretación de los resultados mediante el sistema microbiológico ResScreen®

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

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

Las muestras de leche que contienen residuos de betalactámicos producirán resultados positivos en ambos bioensayos, las muestras que contengan residuos de tetraciclinas ocasionarán resultados positivos a bioensayo BT y negativos a bioensayo BS, mientras que las muestras de leche que contengan sulfamidas darán respuestas positivas a bioensayo BS y negativas a bioensayo BT. Por el contrario, en caso que las muestras de leche estén libres de residuos, se producirá el desarrollo del microorganismo en ambos métodos (resultados negativos).

IV.1.4. Análisis estadístico de los resultados

Con el propósito de modelar la distribución de frecuencias de muestras que contienen antibióticos betalactámicos, tetraciclinas y sulfamidas con el tiempo de muestreo se utilizó el modelo de regresión logística para el análisis de datos dicotómicos (positivo o negativo). Para ello se utilizó la opción stepwise del modelo de regresión logístico que permitirá describir la distribución de frecuencias relativas de resultados positivos a lo largo del año e incorporar al modelo las variables significativas ($p < 0.05$) en forma secuencial.

El estudio estadístico se realizó utilizando el siguiente modelo estadístico de cuarto orden:

$$L_{ij} = \text{Logist} [P_{ij}/(1-P_{ij})] = \beta_0 + \beta_1 T_i + \beta_2 T_i^2 + \beta_3 T_i^3 + \beta_4 T_i^4 + \varepsilon_{ij}$$

Donde: L_{ij} : función logística, P_{ij} : probabilidad de resultado positivo y $(1 - P_{ij})$: probabilidad de resultado negativo, $\beta_0, \beta_1, \beta_2, \beta_3, \beta_4$: coeficientes estimados por el modelo de regresión logística; T_i : efecto del tiempo (expresado en meses), T_i^2 : efecto cuadrático del tiempo (expresado en meses²), T_i^3 : efecto cúbico del tiempo (expresado en meses³); T_i^4 : efecto de cuarto orden del tiempo (expresado en meses⁴) y ε_{ij} : error residual del modelo.

Esta ecuación polinómica de cuarto orden permite modelizar curvas de distribución bimodal con la presencia de dos picos de máxima frecuencia de resultados positivos a cualquiera de las familias de antibióticos estudiados.

Materiales y Métodos

Por último, con el propósito de evaluar la concordancia entre las frecuencias reales y las frecuencias estimadas mediante el modelo logístico, se utilizó el test de bondad de ajuste. Diferencias pequeñas entre las frecuencias reales y las frecuencias estimadas para cada mes, se ponen de manifiesto por los bajos valores de “ χ^2 ”, acompañados de elevados valores de “p”. De este modo, valores de probabilidad de cometer un error superior a 0,10 señalan un adecuado ajuste logrado mediante el modelo de cuarto orden.

IV.2. Efecto de la calidad higiénico – sanitaria de leche sobre la presencia de residuos de ATBs en la leche

IV.2.1. Determinaciones analíticas

A cada muestra de leche de tanque procedente de tambos que entregan leche a las pequeñas empresas lácteas de la región centro-santafesina se le efectuaron las siguientes determinaciones de calidad en el laboratorio lactológico LaRSA (Laboratorio Regional de Servicios Analíticos) dependiente de ALECOL (Asociación del Litoral de Entidades de Control Lechero):

1. *Composición química*: El análisis de la composición química de la leche (materia grasa, proteínas, lactosa y sólidos totales) se efectuó mediante el equipo automático Bentley 2000 (Bentley Instruments Inc, USA). Se trata de un equipo basado en la espectroscopía de infrarrojo, que permite obtener resultados rápidos, precisos y fiables para un elevado número de muestras de leche por hora. Las muestras de leche se procesaron durante

Materiales y Métodos

las dos horas siguientes a su recolección, previo calentamiento a 40°C y agitación suave antes de su análisis con Bentley 2000. Las determinaciones se realizaron por duplicado y se calculó el promedio para cada componente.

2. *Recuentos de Células Somáticas*: Para la realización del recuento celular se utilizó un equipo Somacount 300 (Bentley Instruments Inc, USA), siguiendo la metodología descrita por la Federación Internacional del Lechería (ISO 13366-2, 2006). El equipo utiliza la tecnología de la citometría de flujo que ha demostrado ser fiable y precisa en la determinación cuantitativa de células somáticas en la leche de vaca. Las lecturas de cada muestra de leche se presentan en un lector digital del equipo que deben multiplicarse por 1.000 para expresar los resultados en células/ml de leche.

3. *Recuento de Gérmenes*: Para la realización del recuento bacteriológico (u.f.c/ml) se utilizó un equipo BactoCount IBC 50 (Bentley Instruments Inc, USA). El equipo es completamente automatizado que utiliza la citometría de flujo para el recuento rápido de las bacterias individuales en la leche cruda. Dicho equipamiento está calibrado para transformar el valor de recuento de bacterias en una estimación de las UFC. Así, las lecturas del equipo que se presentan en el lector digital y deben multiplicarse por 1.000 para presentar en el lector digital un valor que al

Materiales y Métodos

multiplicarse por 1.000 expresar los resultados en UFC/ml de leche. Se trata de un método sencillo, preciso y rápido. Entre las principales ventajas destacar su rapidez, debido a que no necesita la incubación de las muestras para el crecimiento bacteriano, ya que el recuento se realiza directamente y se obtienen los resultados en un tiempo reducido.

IV.2.2. Análisis estadístico de los resultados

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 (RG). Posteriormente, a fin de establecer una relación entre los parámetros higiénico-sanitarios de la leche (RCS y RG) se utilizó el modelo de regresión logística, que permite explicar la frecuencia de aparición de los resultados positivos a ambos bioensayos, en términos de las variables predictivas. Para tal fin se utilizó la opción stepwise del modelo logístico de segundo orden. Mediante esta opción es posible incorporar en forma secuencial aquellas componentes de la leche que explican en forma significativa la frecuencia de resultados positivos en los métodos. La ecuación logística empleada fue la siguiente:

$$L_{ij} = \text{Logist} [P_{ij}/(1-P_{ij})] = \beta_0 + \beta_1RCS_i + \beta_{11}RCS_i^2 + \beta_2RG_i + \beta_{22}RG_i^2 + \beta_{12}RCS_iRG_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde las variables son: L_{ij} : función logística, P_{ij} : probabilidad de resultado positivo y $(1 - P_{ij})$: probabilidad de resultado negativo, β_0 , β_1 , β_{11} , β_2 , β_{22} , β_{12} :

Materiales y Métodos

coeficientes estimados por el modelo de regresión logística; RCS_i : efecto del Logaritmo del Recuento de Células Somáticas RCS_i^2 : efecto del cuadrado Logaritmo del RCS, RG_i : efecto de los Logaritmos Recuentos de Gérmenes Totales, RG_i^2 : efecto del cuadrado los Logaritmos RG, $RCS_i RG_i$: interacción entre los Log RCS y los Log RG, ε_{ij} : error residual.

IV.3. Efecto de variables ambientales sobre las frecuencias de resultados positivos de antibióticos en leche

Cada región climática, tiene sus condiciones ambientales (temperatura, precipitaciones, humedad, vientos, suelos) que la caracterizan y definen (Viglizzo *et al.*, 2005). Estas condiciones hacen a una región, más o menos, apta para la implantación de diferentes sistemas de producción animal (Herrero y Gil, 2008). Consecuentemente, existen regiones donde las producciones lácteas intensivas de alto rendimiento se adaptan a la región, mientras que, en otros lugares y en determinadas épocas del año, se generan inconvenientes en la producción (Viglizzo *et al.*, 2005; Herrero y Gil, 2008). Las mencionadas condiciones ambientales someten a los animales a circunstancias extremas que afectan su comportamiento, su estado sanitario y consecuentemente, su producción, no solo en cantidad sino, fundamentalmente, en el detrimento de la calidad de la leche (Torremorell, 2010). Esta situación se agrava con la intensificación de los sistemas de producción animal y las modificaciones genéticas que generaron animales de alta producción (Herrero y Gil, 2008).

En lo que respecta al presente trabajo, cabe destacar que la cuenca lechera centro santafesina se corresponde con la zona norte de la región pampeana de Argentina,

Materiales y Métodos

caracterizada por un clima templado-húmedo sin estación seca y con veranos muy calurosos (Schnack *et al.*, 2000; Tsakoumagkos *et al.*, 2000).

Magrin *et al.* (2006) caracterizaron la región pampeana argentina y reportaron que en su zona norte, según lo establecido por la serie histórica anual de 1961-1990, presenta límites climáticos entre las isohietas de 800 mm totales anuales en el oeste y 1200 mm totales anuales en el este, entre las isotermas de temperaturas máximas medias anuales de 24 °C en el sur y 26 °C en el norte y entre las isotermas de temperaturas mínimas medias anuales que oscila entre 10 °C y 14 °C.

Por todo ello, y debido al notable impacto que presentan los factores ambientales sobre la calidad higiénico-sanitaria de la leche se consideró conveniente evaluar los efectos que producen la temperatura ambiente y las precipitaciones registradas en la región centro santafesina sobre los Recuentos de Células Somáticas y los Recuentos de Gérmenes Totales y su relación con los ATBs en la leche.

Para tal fin se registraron los valores de temperatura ambiente (máxima y mínima) y precipitaciones suministrados por la Estación Agrometeorológica dependiente de EER-INTA Rafaela (Estación Experimental Rafaela del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria de Argentina).

IV.3.1. Análisis estadístico de los resultados

IV.3.1.1. Efecto de la temperatura ambiente y las precipitaciones sobre los RCS y RG

Con el propósito de establecer una relación funcional entre los niveles de células somáticas y gérmenes totales presentes en la leche con la temperatura ambiente y las

Materiales y Métodos

precipitaciones, se utilizó la opción stepwise del siguiente modelo de regresión múltiple de segundo orden:

$$\text{Log}[Y]_{ij} = \beta_0 + \beta_1 T_j + \beta_2 P_j + \beta_{11} T_i^2 + \beta_{22} P_i^2 + \beta_{12} T_i P_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde [Y]: variable dependiente (RCS o RG), β_0 , β_1 , β_2 , β_{11} , β_{22} , β_{12} : parámetros estimados por el modelo de regresión lineal múltiple, T_i : efecto de la temperatura, P_i : efecto de las precipitaciones, T_i^2 : efecto del cuadrado de la temperatura, P_i^2 : efecto del cuadrado de las precipitaciones, $T_i P_i$: efecto de la interacción entre temperatura y precipitación, ε_{ij} : error residual del modelo

IV.3.1.2. Efecto de la temperatura ambiente y las precipitaciones sobre las frecuencias de antibióticos en la leche

Para establecer una relación entre las variables ambientales con la frecuencia de muestras de leche que contienen residuos de betalactámicos, tetraciclinas y/o sulfamidas, se utilizó el modelo de regresión logística para respuesta binaria. Se postuló un modelo de segundo orden interactivo y se utilizó la opción stepwise del modelo logístico. De este modo, se incorporan en forma secuencial aquellas variables de tipo climatológicas que contribuyen a explicar en forma significativa la probabilidad de obtener muestras de leche positivas a las pruebas de antibióticos. El modelo de segundo orden utilizado fue el siguiente:

$$L_{ij} = \text{Logist} [P_{ij}/(1-P_{ij})] = \beta_0 + \beta_1 P_i + \beta_{11} P_i^2 + \beta_2 T_i + \beta_{22} T_i^2 + \beta_{12} P_i T_i + \varepsilon_{ij}$$

Materiales y Métodos

Donde las variables son: L_{ij} : función logística, P_{ij} : probabilidad de resultado positivo y $(1 - P_{ij})$: probabilidad de resultado negativo, $\beta_0, \beta_1, \beta_{11}, \beta_2, \beta_{22}, \beta_{12}$: coeficientes estimados por el modelo de regresión logística; P_i : efecto de las precipitaciones (en mm), P_i^2 : efecto del cuadrado de las precipitaciones, T_i : efecto de la temperatura media ($^{\circ}\text{C}$), T_i^2 : efecto del cuadrado de la temperatura, $P_i T_i$: interacción entre las precipitaciones y la temperatura media y ε_{ij} : error residual.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V.1. Relevamiento de la presencia de residuos de ATBs en pequeños tambos de la zona centro de Santa Fe

V.1.1. Inhibidores presentes en la leche

Las calificaciones visuales del Sistema ResScreen[®] se establecieron en términos de “negativo” y “positivo”. La **Tabla V.1** presenta la distribución de frecuencias absolutas y relativas de los resultados visuales obtenidos en el análisis de cribado de 3.309 muestras de leche bovina, a lo largo del año 2010. En dicha tabla, se observa un 93,74 % de frecuencias de casos negativos a bioensayo BT (6,26 % positivos) y un 94,56 % para el bioensayo BS (5,44 % positivos).

Tabla V.1. Frecuencias absolutas y relativas de inhibidores en leche bovina analizadas por el Sistema ResScreen[®]

Bioensayo	Frecuencia absolutas		Frecuencias relativas	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
BT	207	3102	6,26	93,74
BS	180	3129	5,44	94,56

n: 3309 muestras de leche.

En la última década, debido a la implementación de planes rigurosos de control de residuos e inhibidores en leche, numerosos países han disminuido estas frecuencias de antimicrobianos. Así, por ejemplo, los resultados de inhibidores en leche señalan valores de 0,18 % en España, 0,34 % en Italia, 0,11 % en Bélgica, 0,04 % en Holanda,

Resultados y Discusión

0,044 % en Estados Unidos y 0,04 % en Alemania según estudios realizados por Sánchez *et al.* (2001), Ghidini *et al.* (2003), FAVV (2003), MCS (2004), Dalton (2006) y Kress *et al.* (2007), respectivamente.

Por el contrario, estudios desarrollados en otros países del mundo, diferentes a la Comunidad Europea y Estados Unidos, reportan frecuencias más elevadas de inhibidores en leche. En efecto, los niveles de este análisis resultaron ser del 8 % en Barbados y el Caribe (Baynes *et al.*, 1999), 10 % en Jamaica (Baynes *et al.*, 1999), 18,6 % en México (Camacho Díaz *et al.*, 2010), 16,1 % en Perú (Ortiz *et al.*, 2008), 23% en Venezuela (Faria Reyes *et al.*, 2002) y 25 % en Colombia (Mattar *et al.*, 2009).

De todo ello, y considerando los resultados de Tabla V.1, se puede establecer que la frecuencia de resultados positivos a los métodos de inhibidores de los pequeños tambos de la cuenca lechera centro santafesina no ha llegado a equiparar los bajos valores obtenidos en los países miembro de CEE y USA. Por el contrario, cuando se comparan las frecuencias determinadas en este trabajo con las señaladas para otros países de América Latina en vías de desarrollo, se observa que la situación de los pequeños tambos santafesinos no es tan peligrosa como la del resto de los países latinoamericanos, exceptuando Brasil, en lo que respecta a presencia de ATBs en leche.

En **Figura V.1** se visualizan las distribuciones de resultados positivos al Sistema ResScreen[®] a lo largo del año 2010. Las frecuencias relativas de inhibidores en las muestras de leche de estos pequeños tambos revelan un comportamiento estacional. Así, durante los meses de fin de verano y principio de otoño (febrero, marzo y abril) se registraron porcentajes de casos positivos al bioensayo BT y bioensayo BS cercanos a 11 % y 10 %, respectivamente. Por el contrario, durante los meses invernales (junio,

Resultados y Discusión

julio y agosto) las frecuencias de inhibidores en leche fueron más bajas y resultaron próximos al 4% para ambos métodos. A continuación, las frecuencias de casos positivos aumentan durante los meses de primavera (septiembre, octubre y noviembre) con valores medios cercanos al 6 % (**Figura V.1**). De este modo, se presentan dos picos con máximas frecuencias de resultados positivos, poniendo de manifiesto un comportamiento bimodal.

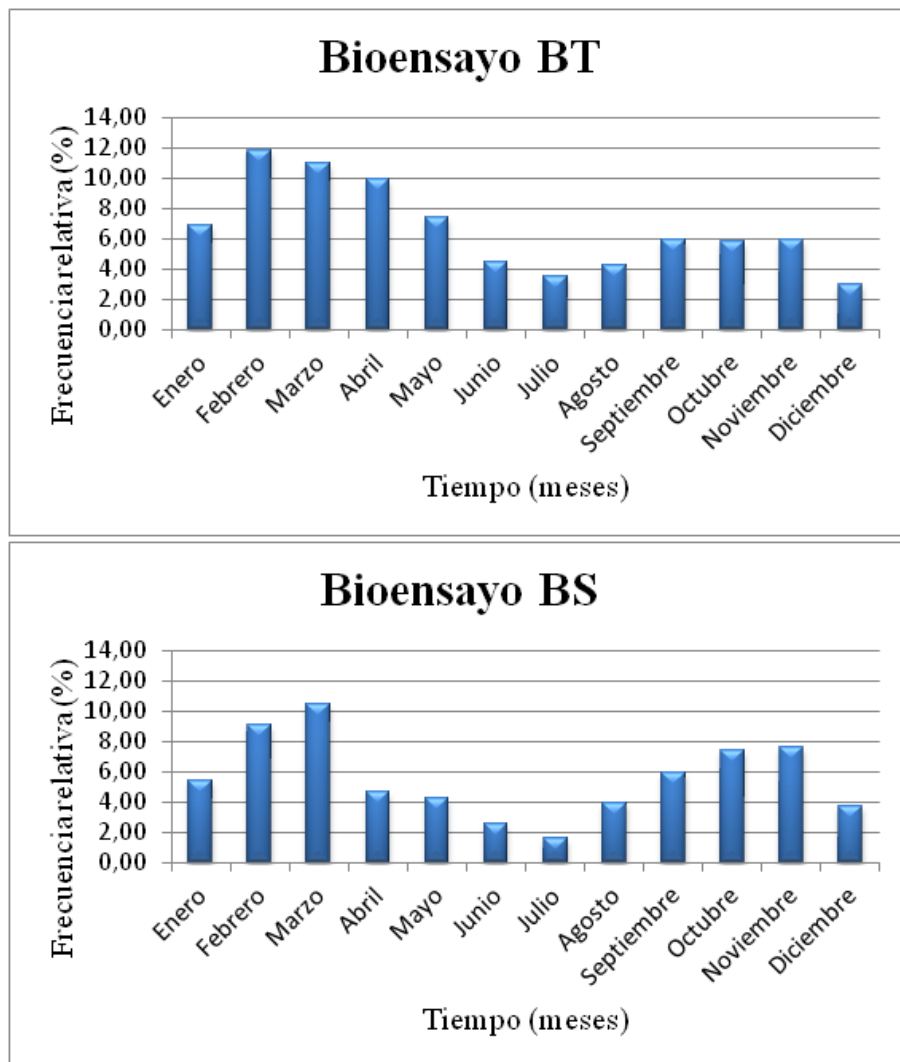


Figura V.1. Distribución de las frecuencias de inhibidores en muestras de leche bovina analizadas por el Sistema ResScreen®

Resultados y Discusión

En investigaciones realizadas en varios países desarrollados se puede observar una cierta estacionalidad en la presencia de inhibidores en leche, que se va haciendo menos marcada a medida que disminuyen los porcentajes de inhibidores en leche. Así, en el estado de Nueva York (USA), se analizaron 1.794 muestras de leche fresca pasteurizada durante los meses de la primavera y verano, obteniéndose 7 % de inhibidores en leche. Además, las frecuencias reportadas en primavera fueron significativamente mayores que en verano (Kosikowsky *et al.*, 1952), a diferencia de la encontrado en este trabajo. Al aplicar programas de control de residuos en leche, con el transcurso del tiempo, la situación en USA fue cambiando, tal es así que, un estudio realizados por Van Schaik *et al.*, (2002) señala un 0,4 % de resultados positivos cuando analiza un total de 41.351 muestras de leche. En dicho trabajo no se destaca ninguna estacionalidad en la frecuencia de residuos de antibióticos en el período estudiado (marzo de 1999 a diciembre de 2000).

Un estudio realizado por Bonfoh *et al.* (2003) donde analizan 220 muestras de leche fresca procedentes de 18 puntos de venta en Bamako (Malí) mediante la prueba del yogur (método de inhibición microbiológica), detectan un 6 % de resultados positivos a dicho test de inhibidores en leche. Además, estos autores señalan que la leche analizada durante la temporada de lluvias de verano (julio a octubre) contenían menos frecuencia de residuos de antibióticos que durante el resto del año, destacando una estacionalidad en la frecuencia de residuos, contrariamente a lo ocurrido en este trabajo, donde en los veranos lluviosos las frecuencias aumentaron.

Pintić *et al.* (2006) evaluaron la frecuencia de residuos inhibidores en la leche analizadas en el Laboratorio Central de Control de Leche del Centro Ganadero de

Resultados y Discusión

Croacia durante siete meses (107.840 muestras) utilizando los métodos Delvotest MCS para inhibidores y Delvo-X-Press[®] (DSM Food Specialties, The Netherlands) para betalactámicos. En dicho estudio se detectan 2,03 % de inhibidores y 1,34 % de antibióticos betalactámicos en leche, correspondiendo la frecuencia mas elevada de inhibidores a los controles de los meses de otoño, mientras que, el mayor valor antibióticos betalactámicos (1,34 %) se encontró en primavera. Sin embargo y a diferencia de lo hallado en esta tesis, dichos autores no destacan diferencias significativas en las frecuencias obtenidas durante las estaciones de otoño, invierno y primavera, tanto para inhibidores como para residuos de betalactámicos.

Un estudio realizado por Zajac *et al* (2012) donde analizan 19.475 muestras de leche cruda de vaca de granjas lecheras en Eslovaquia, detectan un 0,087% de resultados positivos. Estos autores destacan además que, la leche analizada durante finales del otoño y los meses de primavera y verano contenían mayores frecuencias de residuos de antibióticos que durante el resto del año, mostrando similar estacionalidad en la frecuencia de inhibidores que las encontradas en los pequeños tambos de la cuenca centro de Santa Fe.

Para otras especies diferentes al vacuno, los estudios de relevamientos realizados con leche de oveja en España a lo largo de un año muestran una marcada estacionalidad de resultados positivos a la presencia de inhibidores. De este modo, Yamaki *et al.* (2004) cuando analizan 2686 muestras de leche de oveja con el método microbiológico Delvotest[®] SP en Castilla La Mancha (España), reportan frecuencias cercanas al 8 % en los meses de verano que disminuyen hacia el invierno hasta alcanzar valores del 2,5 %. En forma similar, un estudio realizado por Althaus *et al.* (2007) donde analiza 7514

Resultados y Discusión

muestras de leche procedentes de ovejas Manchega en la misma región de España durante el año 2006, observan una mayor frecuencia de resultados positivos al método BRT[®] AiM en los meses de otoño y verano con un aumento de las frecuencias de inhibidores alcanzando un 3,6 %, mientras que durante los meses de primavera estas frecuencias de resultados positivos disminuyen a un 0,8 %, poniendo de manifiesto una estacionalidad en la presencia de inhibidores en la leche ovina.

En el presente trabajo se encontró una estacionalidad en las frecuencias de inhibidores en leche con un aumento a fines del verano, similar a lo reportado para leche ovina en España (Yamaki *et al.*, 2004; Althaus *et al.*, 2007). Sin embargo, los porcentajes de resultados positivos en leche se elevan en los meses de verano (enero y febrero) y a principio de primavera (septiembre, octubre y noviembre) según se visualiza en **Figura V.1**, evidenciando un comportamiento bimodal con dos picos de máxima frecuencia de inhibidores en leche.

V.1.2. Identificación de la naturaleza de los residuos presentes en la leche

Para identificar la naturaleza de las sustancias inhibidoras mediante el Sistema microbiológico ResScreen[®] se utilizó el cuadro de interpretación de los resultados (**Tabla IV.1**). De este modo, aquellas muestras que presentaron resultados positivos a ambos bioensayos señalan la presencia de antibióticos betalactámicos, mientras que las muestras que otorgaron resultados positivos a métodos BT y negativos a BS manifiestan la presencia de tetraciclinas. Por el contrario, resultados negativos al bioensayo BT y positivos el bioensayo BS indican la presencia de sulfamidas. Aquellas muestras de leche que resultan negativas a ambos bioensayos señalan la ausencia de antimicrobianos

Resultados y Discusión

(o presentes a niveles inferiores a los CC β del método o no detectados por este). En **Tabla V.2** se resume las frecuencias absolutas y relativas porcentuales para los antibióticos pertenecientes a estas tres familias detalladas.

Tabla V.2. Clasificación de las frecuencias de inhibidores en leche según el sistema microbiológico ResScreen[®]

Antibióticos	Bioensayo BT	Bioensayo BS	Frecuencia Absoluta	Frecuencia Relativa (%)
betalactámicos (*)	Positivo	Positivo	100	3,02
Tetraciclinas	Positivo	Negativo	107	3,23
Sulfamidas	Negativo	Positivo	80	2,42
Ausencia o no detectable	Negativo	Negativo	3022	91,33

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

Se observa que del total de resultados positivos (8,67 %), un 3,02 % corresponden a betalactámicos, un 3,23 % a tetraciclinas, mientras que la frecuencia de las sulfonamidas resultó más baja (2,42 %).

De la totalidad de casos positivos detectados mediante el sistema microbiológico ResScreen[®] se puede establecer que un 34,8 % corresponden a residuos de betalactámicos, un 37,3 % a tetraciclinas y el 27,9 % restante a sulfonamidas. Por ello, los betalactámicos y las tetraciclinas constituyen los residuos más frecuentes, aunque la presencia de sulfonamidas no es despreciable.

Las investigaciones realizadas en los últimos años en diferentes países, revelan notorias diferencias en las naturalezas de los residuos de antibióticos encontrados en leche. De este modo, un estudio realizado por Kress *et al.*, (2007) en el Instituto de

Resultados y Discusión

Ciencias de la Alimentación Veterinaria de la Universidad Justus Liebig en Alemania, durante los años 2003 al 2005, destacan 63 muestras de leche con residuos de antibióticos sobre un total de 157.500 muestras analizadas. Para la identificación de los residuos de antibióticos utilizaron pruebas de inhibición microbiológica y pruebas de receptores e inmunoensayos enzimáticos (EIA). Entre las muestras positivas se identificaron residuos de penicilina G (74,6 %), ceftiofur (11 %), ampicilina (6,3 %) y sulfonamidas (1,6 %). Estos resultados indican que la penicilina constituye la molécula de antibiótico más frecuente en las muestras de leche de tanque.

A su vez, en un estudio que se llevó a cabo entre octubre de 2007 y mayo de 2008 para detectar niveles de residuos de oxitetraciclina y penicilina G en leche de tanque en granjas lecheras de Etiopía, se analizaron 400 muestras mediante el ensayo Delvotest SP-NT. Este estudio reveló que de las 46 muestras (11,5 %) de leche positivas para los residuos de antibióticos, el 73,91% contenían oxitetraciclina y el 17,39% penicilina G (Abebew, 2008).

Mientras que, un trabajo realizado en Turquía donde analizaron 240 muestras de leche provenientes de siete firmas comerciales, Temamoğulları y Kaya (2010) reportan un 0,4 % de resultados positivos a la presencia de inhibidores en leche. El total de dichos resultados positivos correspondían a residuos de Ampicilina, no señalando otras sustancias indagadas, en las muestras de leche como son amoxicilina, cloxacilina, danofloxacina, enrofloxacina, eritromicina y florfenicol.

En países altamente desarrollados como Estados Unidos, donde se aplican planes rigurosos de prevención y control de residuos de antibióticos en leche desde hace

Resultados y Discusión

muchos años, la frecuencia de inhibidores actualmente resulta un hecho casi accidental (Weber *et al.*, 1995).

Así, se puede observar que un estudio previo a la aplicación de dichos programas, donde se analizan muestras de leche comerciales provenientes de los estados de Pennsylvania, New Jersey y New York realizado por Brady y Katz (1988), reportan que de un total de 2100 muestras de leche analizadas, solamente 63 tenían residuos de antibióticos (0,2 %). A su vez, entre las muestras positivas se encontraron que presentaban un único residuo (62 %), dos residuos diferentes (27 %) o tres tipos distintos de antibióticos (11 %), siendo las tetraciclinas y las sulfonamidas las sustancias detectadas en forma mayoritaria.

En los últimos años, investigaciones realizadas en otros países de América del Sur destacan que los antibióticos más comúnmente encontrados en leche pertenecen a la familia de betalactámicos y las tetraciclinas. Así, por ejemplo, un estudio desarrollado por Ortiz *et al.* (2008) con 616 muestras de leche de tanque analizadas con el método Copan test[®] durante el año 2007 en Arequipa (Perú), indica un 16,1 % de resultados positivos al test de inhibición microbiológica. Posteriormente, las muestras positivas fueron chequeadas mediante el empleo de test rápido de receptores proteicos específicos para antibióticos betalactámicos (Snap[®]Beta-Lactam) y tetraciclinas (Snap[®]Tetracycline). Los autores obtienen un 88,8 % de resultados positivos a betalactámicos y 61,6 % de muestras positivas a tetraciclinas, puesto que en el 54,5 % de los camiones cisternas se detectaron antibióticos pertenecientes a ambas familias.

Sin embargo, Guerrero *et al.* (2009) analizaron cuarenta muestras de leche cruda comercializada en mercados del distrito del Callao (Perú), entre enero y marzo del año

Resultados y Discusión

2009, con el método presuntivo para antibióticos betalactámicos y tetraciclinas de IDEX Laboratories. Estos autores reportan un 40 % de muestras con resultado positivo a residuos de betalactámicos y no se registran resultados positivos a tetraciclinas.

Un estudio llevado a cabo por Bando *et al.* (2009) que emplean técnica de inmunoensayo enzimático para la detección de antibióticos, de un total de 151 muestras de leche pasteurizada comercializadas en las ciudades del Estado de Paraná (Brasil) entre los meses de marzo de 2005 hasta abril de 2006, encuentran un 41,3% resultados positivos a residuos de antibióticos. Posteriormente, dichos autores proceden a la identificación de su naturaleza y detectan neomicina (6,1 %), estreptomina (4,1 %) y cloranfenicol (8,2 %) a concentraciones inferiores a los límites máximos de residuos permitidos en ese país. Además reportaron una frecuencia de 83,7% de residuos de tetraciclinas seguido de un 10,2% de antibióticos betalactámicos. Cabe destacar que estos autores no analizan residuos de sulfamidas.

Por el contrario, un trabajo llevado a cabo por Noa-Lima *et al.* (2009) para evaluar la frecuencia y naturaleza de los antibióticos presentes en muestras de leche del estado de Jalisco (México) donde analizaron 264 muestras de leche durante el año 2008 revela que las sulfonamidas son los antibióticos más frecuentes. Estos autores reportan un 9,8 % de resultados positivos cuando emplean la prueba de inhibición microbiológica del yogurt. Posteriormente, identifican un 34,6 % de betalactámicos con TwinSensor[®] betalactam test, un 19,2 % de tetraciclinas con TwinSensor[®] Tetracycline test y un 77 % de sulfonamidas mediante técnicas de cromatografía líquida HPLC. Se concluye que los residuos de sulfonamidas son los más frecuentes en las muestras de leche analizadas en México, a diferencia de los valores reportados en Tabla V.2 que

Resultados y Discusión

muestran a las sulfonamidas como los antimicrobianos menos frecuentes en la leche procedente de pequeños tambos de la cuenca centrosantafesina.

Por todo lo anteriormente expuesto, se puede sintetizar que en países de América del Sur, tales como Perú, Brasil y Argentina (**Tabla V.2**) los antibióticos betalactámicos y las tetraciclinas se utilizan ampliamente, mientras que en México resulta notorio el amplio uso de las sulfonamidas. Por estos motivos, resulta necesario que cada región y país lleven a cabo estudios tendientes a evaluar los compuestos más utilizados y que aparecen con mayor frecuencia en la leche, a fin de implementar mecanismos de control eficientes que permitan mejorar la calidad de sus productos asegurando de este modo la salud de los consumidores.

La **Figura V.2** muestra la distribución de frecuencias de las tres familias de antibióticos (betalactámicos, tetraciclinas y sulfamidas) analizadas a lo largo del periodo enero – diciembre del año 2010.

En forma similar a la distribución de frecuencias de inhibidores en leche (**Figura V.1**), la distribución de antibióticos presenta un comportamiento bimodal de tipo estacional con dos picos de máxima frecuencia a finales del verano y principios del otoño (febrero, marzo y abril) y al inicio de la primavera (septiembre, octubre y noviembre), mientras que las frecuencias de antibióticos disminuyen en los meses de invierno (junio y julio).

Para modelar estas distribuciones bimodales de cada antibiótico se utilizó la opción stepwise del modelo de regresión logística. Los resultados se resumen en **Tabla V.3**.

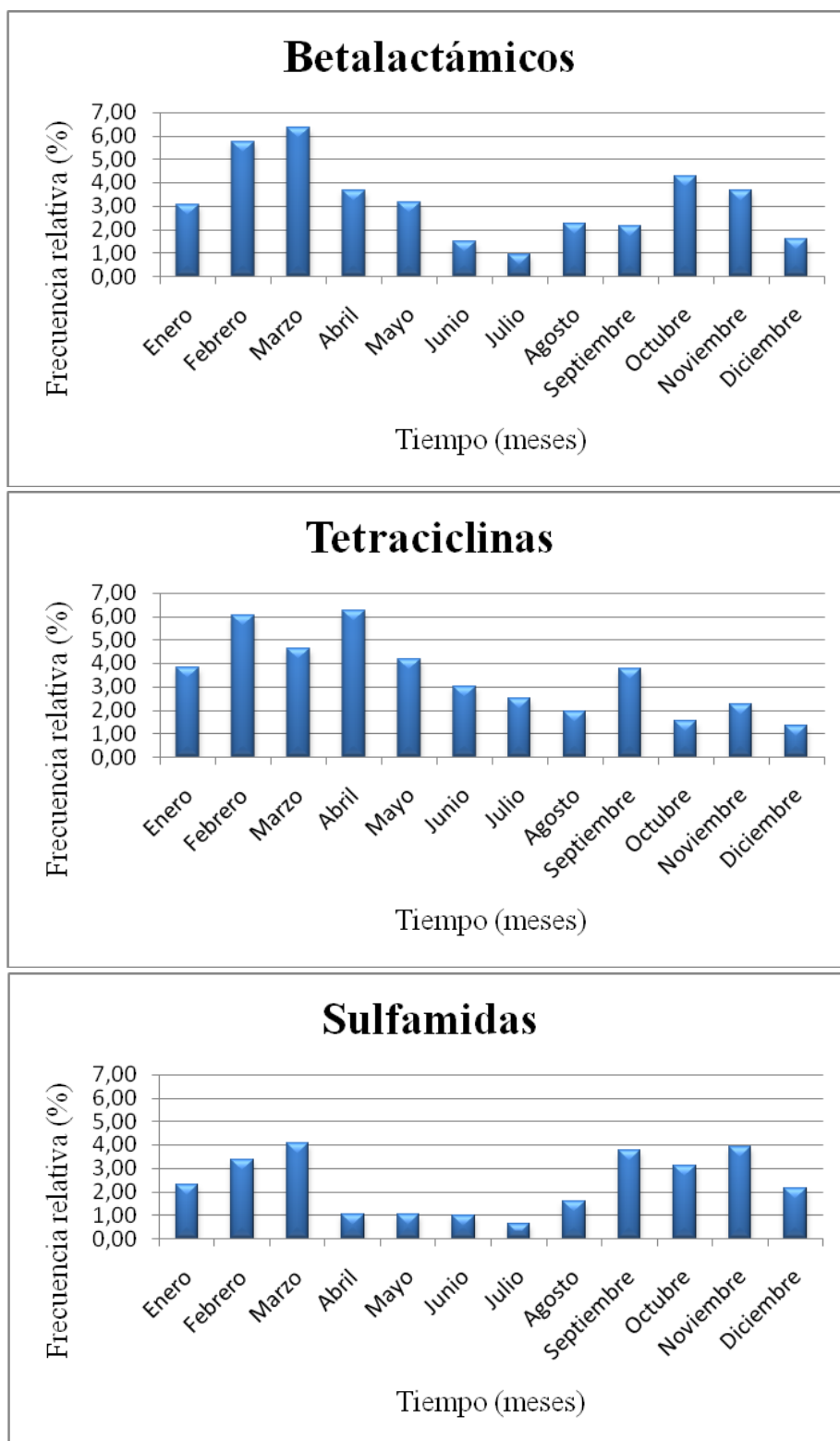


Figura V.2. Distribución de frecuencia de antibióticos en muestras de leche bovina analizadas con el Sistema ResScreen® durante 2010

Resultados y Discusión

Las proporciones mensuales de los antibióticos encontrados en los pequeños establecimientos de la cuenca centro santafesina muestran distribuciones bicuadráticas, con efectos significativos para las variables mes, mes², mes³ y mes⁴ (**Tabla V.3**).

Tabla V.3. Parámetros estadísticos obtenidos mediante el modelo de regresión logística aplicado a las distribuciones de frecuencia de ATBs en leche durante el año 2010

Antibiótico	Variable	Valor χ^2	Valor p
betalactámico	Mes	4,18516	0.0408
	Mes ²	5,68622	0.0171
	Mes ³	5,99628	0.0143
	Mes ⁴	5,93686	0.0148
Tetraciclina	Mes	4,18731	0.0407
	Mes ²	5,29749	0.0214
	Mes ³	5,21783	0.0224
	Mes ⁴	4,97701	0.0257
Sulfamida	Mes	4,77054	0.0289
	Mes ²	7,86721	0.0050
	Mes ³	10,0231	0.0015
	Mes ⁴	11,294	0.0008

Por ello, las ecuaciones de la **Tabla V.4** calculadas mediante el modelo de regresión logística revelan un comportamiento similar para los tres antibióticos evaluados en este estudio, ya que los términos de segundo y cuarto orden resultaron positivos, mientras que los términos de primer y tercer orden presentan signo negativo. Esta similitud en los modelos matemáticos justifica el comportamiento bimodal que se visualiza en la **Figura V.2**.

Tabla V.4. Ecuaciones matemáticas obtenidas mediante el modelo de regresión logístico que expresan las distribuciones de frecuencias de ATBs en leche durante el año 2010

ATBs	$L_{ij} = \log itP_{ij} = \beta_0 + \beta_1 M_i + \beta_2 M_i^2 + \beta_3 M_i^3 + \beta_4 M_i^4$	Test Bondad Ajuste	
		Valor χ^2	Valor p
BTs	$L_{ij} = -4,2231 + 1,8804.M - 0,6485.M^2 + 0,0757.M^3 - 0,0029.M^4$	5,9379	0,1147
TCs	$L_{ij} = -4,0110 + 1,804.M - 0,6095.M^2 + 0,0698.M^3 - 0,0026.M^4$	0,3091	0,9583
SAs	$L_{ij} = -5,3715 + 2,5832.M - 0,9508.M^2 + 0,1183.M^3 - 0,0047.M^4$	0,3723	0,9459

Además se debe destacar que las concordancias de los datos reales con los valores estimados por el modelo logístico han sido satisfactorias porque los valores del estadístico χ^2 del test de bondad de ajuste fueron buenos, con valores de probabilidad mayores a un 10 % ($P > 0,10$) indicando que no existe diferencia significativa entre las frecuencias reales y las frecuencias estimadas por el modelo de cuarto orden.

En **Figura V.3** se visualizan las curvas construidas mediante las ecuaciones de la **Tabla V.4** y los histogramas de frecuencias observados a lo largo del año. Se aprecia que las curvas logísticas modelizan las frecuencias reales, con máximas frecuencias de casos positivos en los períodos febrero-marzo y octubre-noviembre, con mínimas frecuencias en los meses de junio-julio-agosto.

En lo que respecta a la frecuencia de sulfamidas halladas durante el año 2010, se presenta aumento de resultados positivos durante los mismos meses que los antibióticos betalactámicos y las tetraciclinas. Sin embargo los porcentajes de sulfamidas fueron de 4 % y 4,5 % en febrero y octubre, respectivamente, es decir, superiores a las frecuencias de betalactámicos (3,5 %) y tetraciclinas (3,1 %) estimadas por el modelo; mientras que las frecuencias de betalactámicos (7,8 %) y de tetraciclinas (7,7 %) en el período

Resultados y Discusión

febrero-marzo resultó mayor a la frecuencia estimada para las sulfamidas (4,1 %) señalando un mayor uso de betalactámicos y tetraciclinas en comparación con las sulfamidas en los meses de verano y, por el contrario, un mayor uso de las sulfamidas con respecto a los betalactámicos y las tetraciclinas en los meses de primavera (**Figura V.3**).

En un estudio realizado en España para muestras de leche de oveja, se modelizaron las apariciones de resultados positivos y dudosos durante un año utilizando el modelo de regresión logística. La curva ajustada señala una mayor probabilidad de respuestas positivas y dudosas entre el final del verano y el principio del otoño, adjudicándole este incremento a las altas temperaturas y a un alto recuento bacteriológico en leche (Yamaki *et al.*, 2004).

Althaus *et al.* (2007) modelizaron las frecuencias de presentación de antibióticos en leche ovina procedente de Castilla La Mancha (España) durante un año y encontraron un aumento en el porcentaje de resultados positivos a finales del verano.

Los modelos encontrados en este trabajo muestran un aumento de las frecuencias positivas en los últimos meses de verano y los primeros del otoño semejantes a lo reportado por Yamaki *et al.* (2004) y por Althaus *et al.* (2007) para leche de oveja. Contrariamente, en los meses de primavera los resultados positivos en España se mantuvieron bajos (Yamaki *et al.*, 2004), mientras en esta investigación, se halló una nueva elevación de las frecuencias de antibióticos.

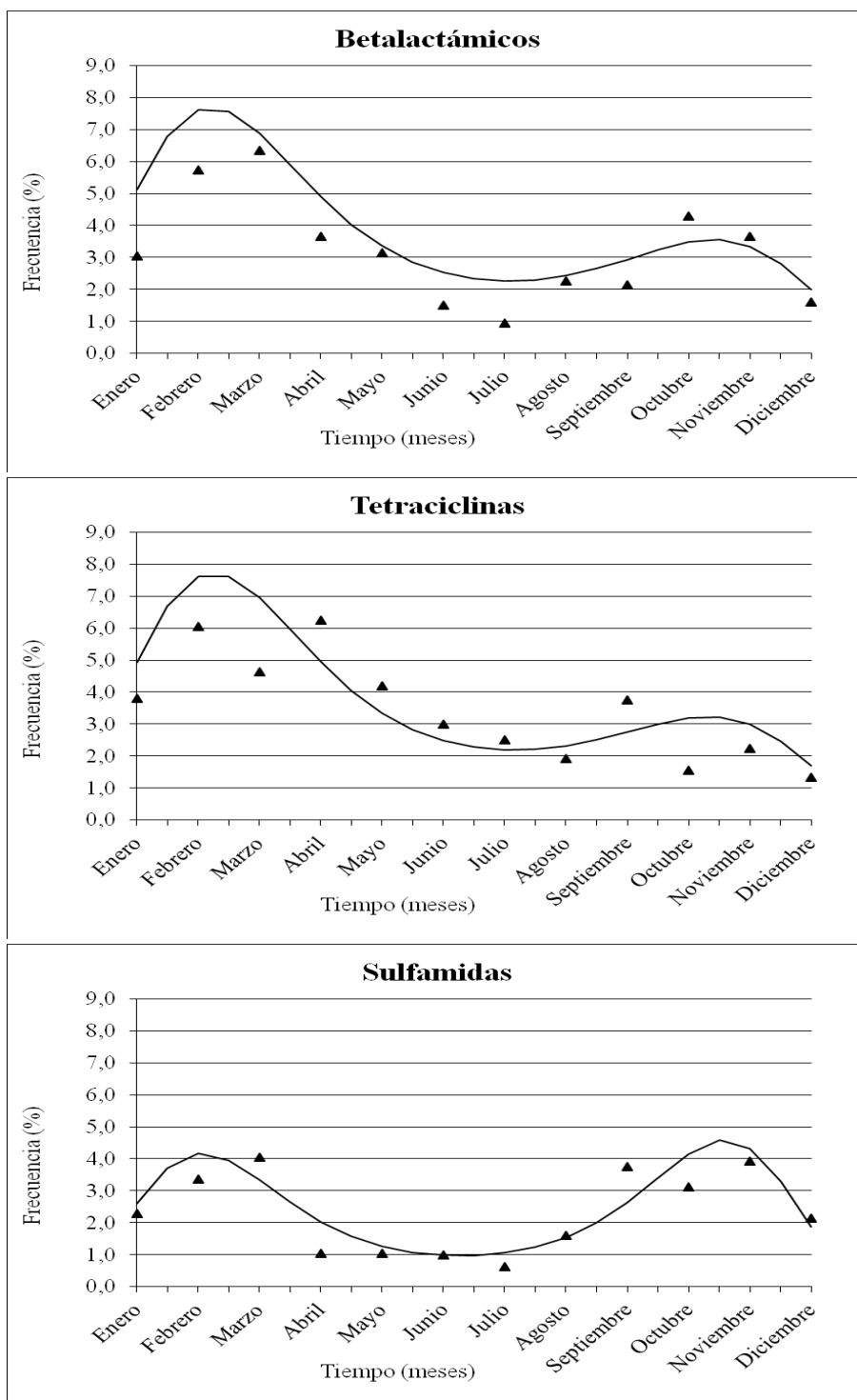


Figura V.3. Ajustes de la distribución de la frecuencia de antibióticos en muestras de leche bovina durante el año 2010 mediante el Modelo de Regresión Logística

V.2. Efecto de la calidad higiénico-sanitario de leche sobre la presencia de residuos de ATBs

V.2.1 Composición de la leche

Los principales parámetros estadísticos de los componentes químicos de la leche analizados a lo largo del año 2010 cuantificados mediante métodos de espectroscopia por infrarrojo se muestran en **Tabla V.5**.

Tabla V.5. Parámetros estadísticos de los componentes químicos de la leche bovina

Variable (g % en ml)	Media	DS	Rango	CV (%)
Grasa	3,69	0,50	2,49-5,95	13,50
Proteína	3,39	0,19	2,64-4,14	5,53
Lactosa	4,72	0,18	3,80-5,33	3,77
Sólidos Totales	12,48	0,60	10,33-14,46	4,78

Se puede mencionar que los valores medios de los principales componentes de la leche de vaca expuestos en **Tabla V.5** resultaron similares a los niveles reportados por Taverna *et al.* (2005) para leche bovina destinada a la elaboración de leche en polvo entera en la cuenca lechera central santafesina de Argentina (3,60 % de grasa, 3,26 % de proteínas, 4,75 % de lactosa y 12,28 % de sólidos totales).

El Laboratorio Integral de Servicios Analíticos (LISA) de Ceres (Santa Fe, Argentina) reporta 3,48 % de grasa, 3,11 % de proteína, 4,74 % de lactosa y 12,18 % de sólidos totales cuando analizan 10704 muestras de leche cruda procedente del pool de

Resultados y Discusión

tanques durante el período comprendido entre los años 1993 y 2009 (Revelli *et al.*, 2011).

En países miembros de la CEE, a partir de los datos obtenidos en el Boletín Mensual de Estadística Agraria y Encuestas Anuales del MAPA y de los Boletines de la Federación Internacional de Lechería (FIL) se reportaron valores de composición de leche ligeramente diferentes de los encontrados en este trabajo, en España (Grasa: 3,72 %, Proteínas: 3,09 %), Francia (Grasa: 4,12 %, Proteínas: 3,19 %), Dinamarca (Grasa: 4,36 %, Proteínas: 3,43 %), Reino Unido (Grasa: 4,15 %, Proteínas: 3,32 %), y Alemania (Grasa: 4,25 %, Proteínas: 3,41 %) según Calcedo (2002).

En otros países miembros de la CEE, diferentes autores indican niveles levemente disímiles a los cuantificados en este trabajo, Akerlind *et al.*, (1999) en Suecia (Grasa: 4,31 %, Proteínas: 3,62 %, L: 4,76 %); Radinović *et al.*, (2011) en Serbia (Grasa: 3,74 %, Proteínas: 3,15 %); Ruska *et al.*, (2012) en Letonia (P: 3,57 %); Zajác *et al.*, (2012) en Eslovaquia (Grasa: 3,78 %, Proteínas: 3,36 %, Lactosa: 4,82) y Caccamo *et al.*, (2012) en Italia (Grasa: 4,05 %, Proteínas: 3,23 %).

A su vez, los valores de composición de la leche reportados por varios autores en otros países son levemente diferentes a los encontrados en este estudio, así, Murphy (1999) en Irlanda (Grasa: 3,81 %, Proteínas: 3,07 %, Lactosa: 4,57 %, Sólidos totales: 14,80 %); Tsenkova *et al.* (2001) en Japón (Grasa: 3,18 %, Proteínas: 3,08 %, Lactosa: 4,41 %); Calderón *et al.* (2006) en Perú (Grasa: 4,42 %, Proteínas: 3,37 %, Lactosa: 4,01 %, Sólidos totales: 12,04 %); Neves *et al.* (2007) en Brasil (Grasa: 3,44 %, Proteínas: 2,87 %, Lactosa: 4,72 %); Leitner *et al.* (2011) en Israel (Grasa: 3,70 %, Proteínas: 3,39 %, Lactosa: 4,98 %); Tasdemir *et al.* (2011) en Turquía (Grasa: 3,43 %, Proteínas: 3,39 %, Lactosa: 4,98 %).

Resultados y Discusión

Proteínas: 3,35 %) y Yasmin *et al.* (2012) en Pakistán (Grasa: 4,85 %, Proteínas: 2,76 %, Lactosa: 5,60 %).

De este modo, se puede establecer que los valores de composición química obtenidos en este trabajo a partir de las muestras de leche de los pequeños tambos de la cuenca centro santafesina durante el año 2010, son similares a los niveles de composición láctea bovina reportados por Taverna *et al.* (2005) y ligeramente diferentes de los informados tanto en otras regiones de Argentina como en otros países.

Con el propósito de visualizar las distribuciones de frecuencias de los componentes químicos de la leche de vaca a lo largo del año 2010 se construyó la **Figura V.4**. Se puede apreciar que el porcentaje de grasa butirosa durante el año se mantuvo prácticamente constante, con fluctuaciones comprendidas entre un 3,61 % durante el mes de octubre y un 3,84 % para el mes de enero. En forma similar, los valores de proteínas (3,35 % en octubre y 3,45 % en abril), lactosa (4,64 % en septiembre y 4,79 % en mayo) y sólidos totales (12,32 % en octubre y 12,77 % abril) presentaron pequeñas variaciones durante el período en estudio, con valores mínimos en primavera y máximos en otoño.

Estas pequeñas diferencias estacionales también fueron reportadas por Calcedo (2002) durante el relevamiento efectuado en el año 1999 en los países miembros de la CEE. En efecto, este autor observa variaciones en los niveles de grasa y proteínas de la leche procedente de España (G: 3,61 % - 3,82 %, P: 3,05 % - 3,15 %), Francia (G: 3,96 % - 4,30 %, P: 3,14 % - 3,25 %), Dinamarca (G: 4,09 % - 4,53 %, P: 3,28 % - 3,52 %), Holanda (G: 4,12 % - 4,58 %, P: 3,37 % - 3,60 %), y Alemania (G: 4,13 % - 4,57 %, P: 3,30 % - 3,51 %).

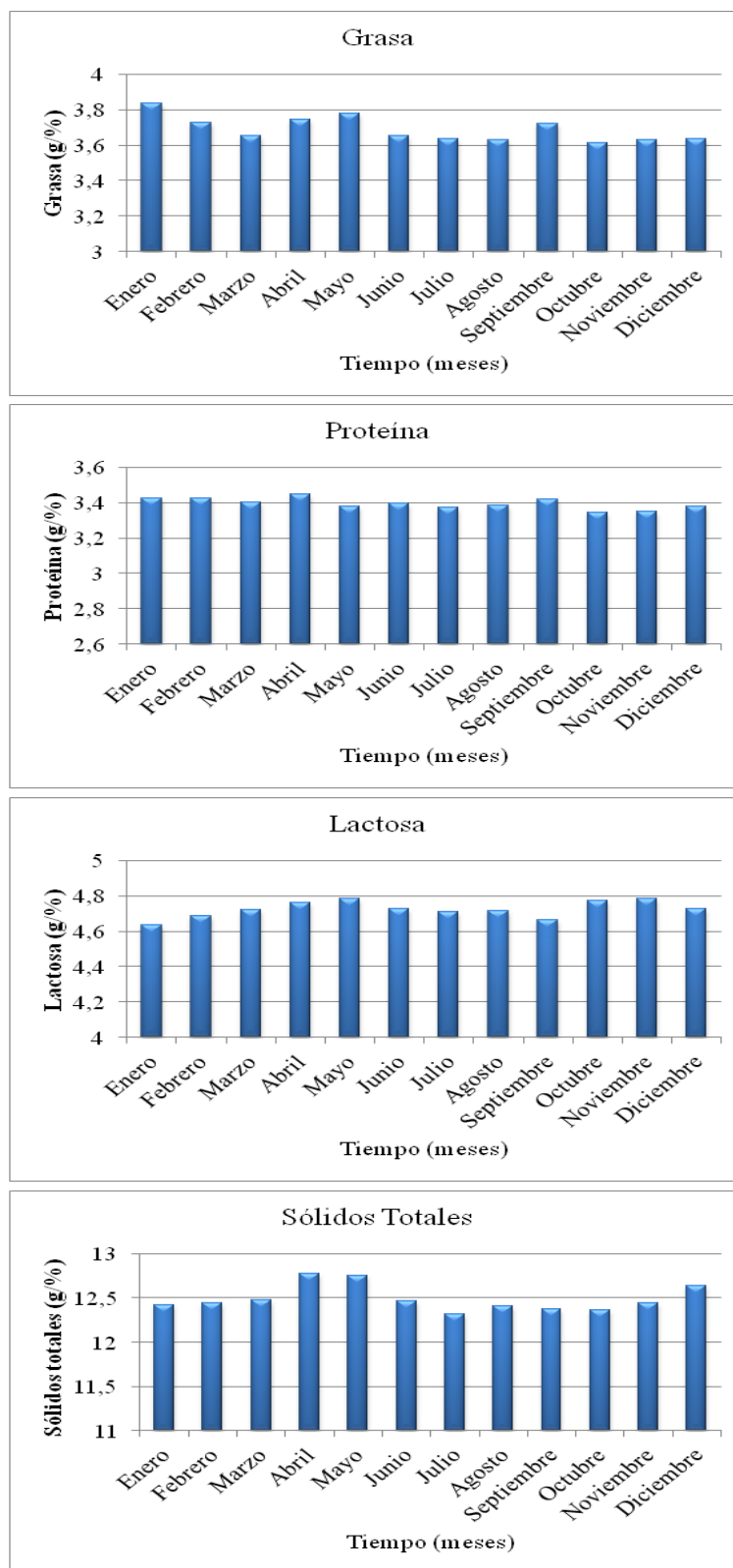


Figura V.4. Distribución de frecuencias de los componentes químicos de la leche durante el año 2010.

Resultados y Discusión

Un estudio realizado en Eslovaquia donde analizaron 24.460 muestras de leche durante el año 2011, reportaron variaciones en los niveles de los componentes químicos en leche. Así, los valores de grasa, proteínas y lactosa se encontraron entre 3,60 % - 4,05 %, 3,23 % - 3,52 % y 4,77 % - 4,87 %, respectivamente (Zajac *et al.*, 2012).

Además, un trabajo llevado a cabo en Pakistán por Yasmin *et al.* (2012) señala variabilidad de los componentes químicos en leche según las estaciones del año; mostrando mayor contenido de grasa (5,4 %), proteínas (3,22 %) y lactosa (6,26 %) en invierno en comparación con los meses de verano (4,3 % de grasa, 2,3 % de proteínas y 4,93 % de lactosa).

En **Figura V.5** se observan las distribuciones de frecuencias de los recuentos de células somáticas y gérmenes contenidos en la muestras de leche de vaca a lo largo del año 2010.

Los recuentos de células somáticas y de bacteriología muestran una distribución bimodal con picos en los meses de verano y primavera (**Figura V.5**), coincidentemente con las distribuciones de los residuos de antibióticos en la leche de los pequeños tambos de la región centro santafesina (**Figura V.2 y Figura V.3**).

En un estudio realizado por Green *et al.* (2006) en Reino Unido sobre un total de 41.726 mediciones de recuentos de células somáticas procedentes de 5386 vacas disponibles en 33 rebaños, reportaron mayores valores mayores en los meses de verano comparados con los meses de invierno.

En otros países, diferentes autores indican estacionalidad con mayor presencia de recuentos de células somáticas en verano, semejantes a las encontradas en este trabajo. Así, se pueden mencionar los estudios de Schukken *et al.* (2003) en Estados

Resultados y Discusión

Unidos, Wicks y Leaver (2006) en Reino Unido, Lindmark *et al.* (2006) en Suecia, Hristov *et al.* (2006) y Radinović *et al.* (2011) en Serbia, Sinapis (2007) en Grecia, Wronski *et al.* (2007) en Polonia, Rysanek *et al.* (2007) en Republica Checa, Fenerova *et al.* (2008) y Petkov *et al.* (2009) en Bulgaria, Rosca *et al.* (2009) en Rumania, Fouz *et al.* (2010) en España y Müller y Sauerwein (2010) en Alemania.

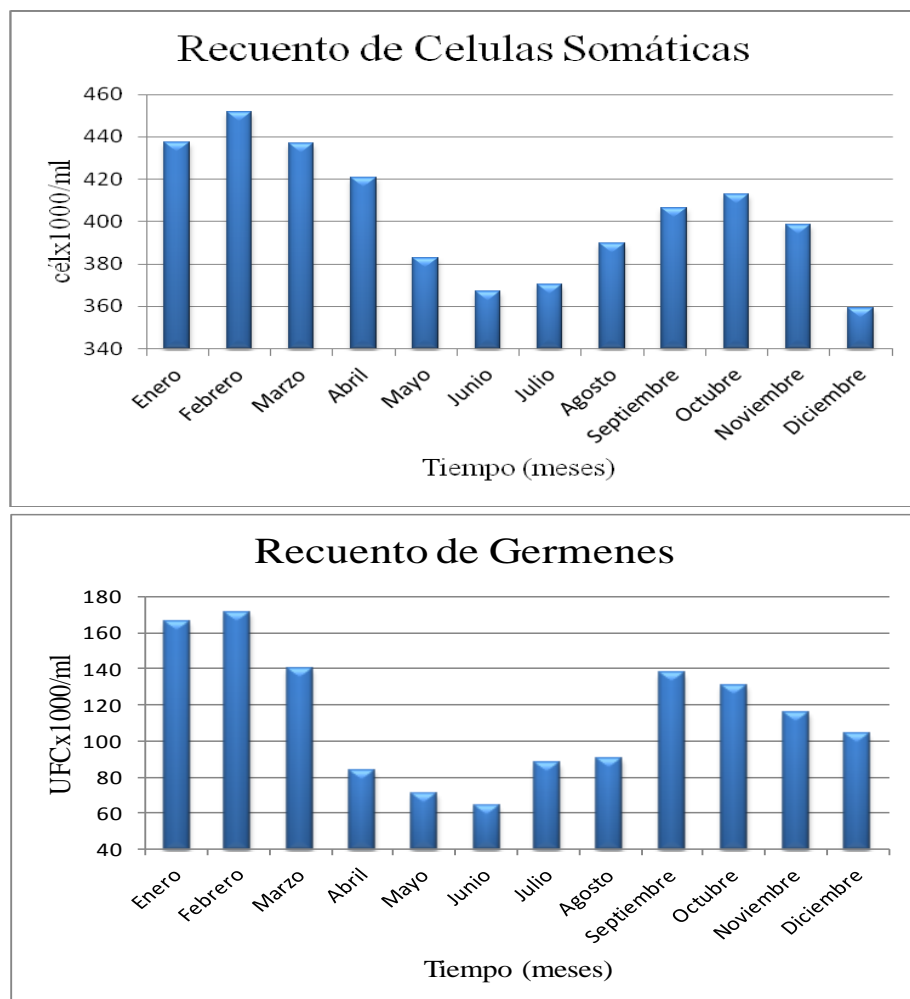


Figura V.5. Distribución anual de los recuentos de células somáticas y recuentos de gérmenes totales de las muestras de leche de los pequeños tambos de la cuenca centro santafesina.

Resultados y Discusión

El aumento en verano de los RCS podría ser causado por un incremento de infecciones intramamarias durante estos meses (Harmon, 1994). En efecto, durante los meses de verano se pueden encontrar rodeos que, teniendo controlado los RCSs producidos por patógenos infecciosos, pueden experimentar problemas de mastitis clínicas causados por patógenos ambientales (Severin, 2008). Cuando aumenta la incidencia de mastitis clínicas, se acrecientan los tratamientos con antibióticos a estos bovinos, incrementándose como consecuencia de ello las probabilidades de aparición de residuos de dichas sustancias en la leche.

Por todo esto, y debido a que las frecuencias de RCS, RG (Figura V.5) y residuos de antibióticos en leche (Figura V.3) muestran formas bimodales similares, se realizó un análisis por regresión logística entre las distribuciones de frecuencias a lo largo de un año de los residuos de antibióticos estudiados con las transformaciones logarítmicas de los RCS y RG.

En **Tabla V.6** se muestran los parámetros estadísticos (χ^2 y p) obtenidos mediante la opción stepwise del modelo de regresión logística. En dicha Tabla se observa tanto para las frecuencias de betalactámicos y sulfamidas que los parámetros analizados (Log RCS, Log² RCS, Log RG, Log² RG y Log RCS.Log RG) no resultaron significativos, mientras que, las frecuencias de residuos de tetraciclinas se vieron influenciados por los términos Log RCS y Log² RCS con un error inferior al 5%.

Así, una vez determinados los parámetros significativos en el modelo de regresión logística se calculó la ecuación matemática que permite predecir la frecuencia de resultados positivos a las tetraciclinas como una función de los RCS (**Tabla V.7**).

Resultados y Discusión

Tabla V.6. Parámetros estadísticos obtenidos mediante la aplicación de método de regresión logística a las distribuciones de frecuencia de ATBs en leche en el año 2010

Antibiótico	Variable	Valor χ^2	Valor p
BETAlactámico	RCS	0,26968	0,6035
	RCS ²	0,19332	0,6602
	RG	0,37066	0,5426
	RG ²	0,69805	0,4034
	RCS*RG	0,24660	0,6195
Tetraciclina	RCS	5,23452	0,0221
	RCS ²	3,82024	0,0506
	RG	2,74673	0,0974
	RG ²	2,27295	0,1316
	RCS*RG	0,20988	0,6469
Sulfamida	RCS	0,15428	0,6945
	RCS ²	0,09129	0,7625
	RG	0,12773	0,7208
	RG ²	0,02467	0,8752
	RCS*RG	3,05896	0,0903

Tabla V.7. Ecuación matemática obtenida mediante el modelo de regresión logístico que expresa las distribuciones de frecuencias de tetraciclinas en leche como una función de RCS.

ATBs	$L_{ij} = \beta_0 + \beta_1 \text{LogRCS}_i + \beta_{11} \text{Log}^2 \text{RCS}_i$	Test Bondad Ajuste	
		Valor χ^2	Valor p
TCs	$L_{ij} = -5,13912 + 0,00718 \cdot \log \text{RCS} - 0,0000061 \cdot \text{Log RCS}^2$	2,21325	0,1368

Por ello, en **Figura V.6** se esquematiza la función matemática que asocia la frecuencia de resultados positivos a tetraciclina en términos de las transformaciones logarítmicas de los RCS, junto con las frecuencias reales observadas para este antibiótico en leche.

En esta figura se visualiza que a bajos niveles de RCS, las frecuencias de aparición de tetraciclinas en leche son bajas. En la medida que se incrementan los RCS, también aumentan las frecuencias de casos positivos al test (signo positivo de β_1 de

Tabla V.7). Para luego estabilizarse en el rango de niveles de RCS comprendida entre $400.10^3 - 600.10^3$ cél/ml (signo negativo del término β_{11} de tabla V.7).

Los RCS en las muestras del tanque se utilizan como un indicador clave de la calidad de la leche y reflejan la prevalencia de mastitis subclínica en el ganado lechero. El RCS es una medida indirecta de la cantidad total de mastitis presentes en tambo, dado que, en tambos con altos RCS se ha informado una mayor prevalencia de mastitis clínica.

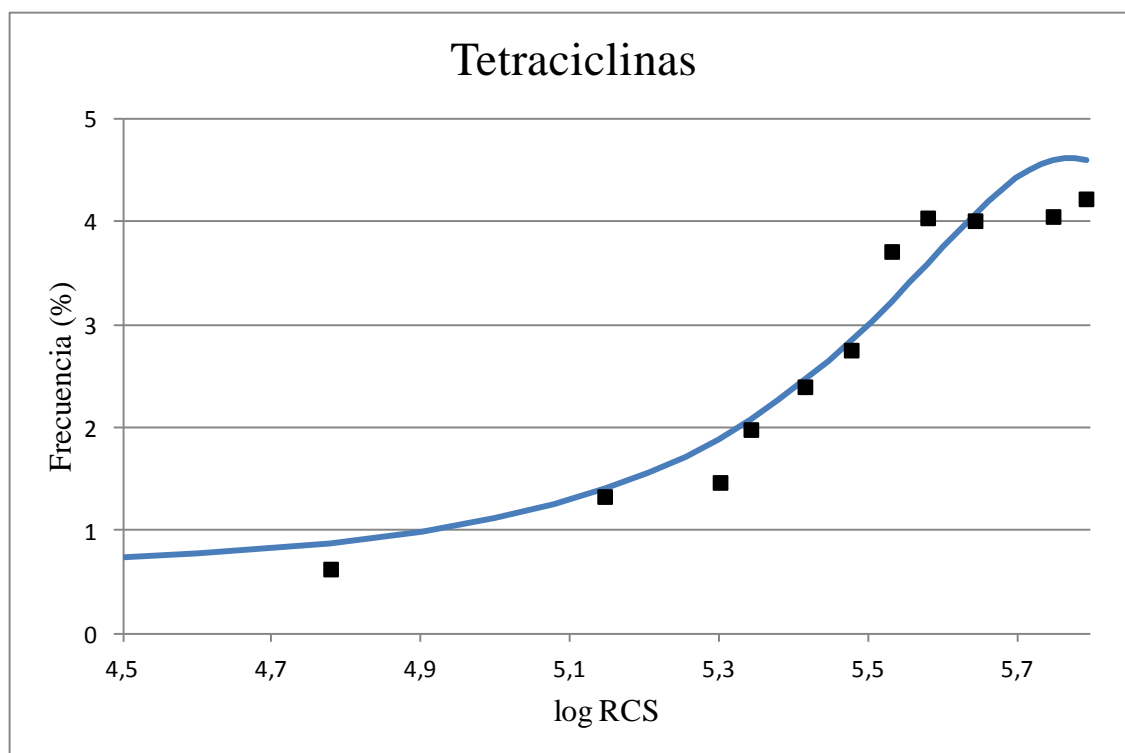


Figura V.6. Modelos de regresión logística que relaciona la distribución de la frecuencia de tetraciclinas en muestras de leche bovina durante el año 2010 y el Recuento de Células Somáticas.

Debido a que la mastitis conlleva a importantes pérdidas económicas, los tambos con elevados RCS tienen una alta motivación para reducir el número de cuartos

Resultados y Discusión

infectados, utilizando tratamientos con antibióticos, incrementando de este modo el riesgo de encontrar residuos de antibióticos en la leche procedente de estos animales tratados (Rodrigues *et al.*, 2004).

En forma similar a la función encontrada en este trabajo, (**Tabla V.7**) otros autores reportan asociaciones similares. Por ejemplo, Sargeant *et al.* (1998) analizaron los datos obtenidos de los rebaños de Ontario en el período comprendido entre marzo de 1985 y julio de 1994, y reportaron la frecuencia de residuos de antibióticos en cada categoría de RCS: 1,6 % (<150.000), 1,6 % (150.000-299.000), 3,4 % (300.000-499.000), 3,7 % (450.000-599.000) y 5,7 % (> 600.000).

Asimismo, en el trabajo de investigación realizado por Saville *et al.* (2000) entre los años 1994 y 1997, donde analizan 28.873 muestras de leche procedentes de animales ubicados en diversas regiones de los Estados Unidos, se reporta que la probabilidad de encontrar residuos de antibióticos en leche aumenta en la media que se incrementan los recuentos de células somáticas.

En Wisconsin (USA), Ruegg y Tabone (2000) analizaron 982.535 muestras de leche en el período comprendido entre los meses de enero de 1995 a noviembre de 1998. Los RCS se utilizaron para clasificar los rebaños en cinco grupos (GRUPO I: < 250.000, GRUPO II: 251.000 a 400.000, GRUPO III: 401.000 a 550.000, GRUPO IV: 551.000 a 700.000 y GRUPO V: > 700.000) y se calculó el riesgo relativo de residuos de antibióticos para cada grupo según los niveles de RCS. La frecuencia de residuos de antibióticos en leche aumentó en aquellos tambos que reportaban mayores niveles de RCS.

Resultados y Discusión

Además, en un estudio realizado por Van Schaik *et al.* (2002) midieron los RCS, RGT y frecuencias de residuos de antibióticos en muestras de leche de las cinco mayores industrias lácteas del estado de Nueva York durante los meses del período comprendido entre marzo de 1999 a diciembre de 2000. Estos autores reportaron que los tambos con altos niveles de RCS también presentaban altos niveles de RGT y elevadas frecuencias de residuos de antibióticos en leche.

En la cuenca de Arequipa (Perú) se analizaron 1814 muestras de leche en el verano del año 2009, de las cuales 59 (3,25 %) resultaron contaminadas con residuos de antibióticos. Estas muestras fueron clasificadas según el valor de RCS en cinco rangos y se establecieron diferencias estadísticas significativas ($p < 0,01$) puesto que los grupos de muestras de leche que contenían mayores RCS, presentaban mayor frecuencia de resultados positivos a las pruebas de inhibidores, mientras aquellos grupos con menores niveles de RCS tenían menores frecuencias de antibióticos en leche (Ortiz *et al.*, 2011).

De este modo, la relación encontrada entre los RCS y la frecuencias de residuos de tetraciclinas en leche obtenida de los pequeños tambos de la cuenca centro santafesina en el año 2010 presenta un comportamiento similar al observado por diferentes autores en otros países.

Cabe destacar que el verano es una época propicia para el desarrollo de enfermedades en el ganado bovino, por lo que normalmente, las vacas son tratadas con antibióticos para evitar dichos problemas, y esto se traduce en un aumento de inhibidores en la leche ordeñada. Así, por ejemplo, la mastitis tiene una incidencia estacional bien definida y es más alta en los meses de verano lluviosos y en zonas bajas (Pérez, 2008).

Resultados y Discusión

Además, se debe considerar que un clima caluroso, húmedo y lluvioso constituye un factor predisponente muy importante que trae aparejado un aumento en la incidencia de casos clínicos, afectando con mayor intensidad a rodeos de pastoreo directo que a rodeos estabulados (Desmoures y Repetti, 2006).

Por ello, en el próximo apartado se procederá a evaluar el efecto de las condiciones ambientales (temperaturas y precipitaciones) sobre la frecuencia de resultados positivos al método microbiológico utilizado para la detección de resultados de antibióticos en la leche.

V.3. Efecto de variables ambientales sobre las frecuencias de antibióticos en leche

V.3.1 Características climáticas de la región

En este trabajo se registraron las condiciones climáticas durante el año 2010 por en la Estación Agrometeorológica dependiente de EER-INTA (Estación Experimental Rafaela del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria de Argentina). Los valores medios anuales, desviaciones estándares, rangos y coeficientes de variación de las temperaturas (máximas y mínimas) y las precipitaciones, a lo largo del año 2010, se resumen en Tabla V.8.

Tabla V.8. Parámetros estadísticos de las temperaturas (máximas y mínimas) y las precipitaciones, a lo largo del año 2010, en la cuenca centro santafesina.

Variable	Media	DS	Rango	CV (%)	Total anual
Temperatura mínima (°C)	11,63	6,55	-5,0-25,1	56,31	-
Temperatura máxima (°C)	25,04	6,41	6,5-38,0	25,60	-
Precipitaciones (mm)	2,20	7,28	0,0-50,3	331,36	802,2

Los niveles de temperatura media máxima (25,04°C), temperatura media mínima 11,63°C) y precipitaciones totales anuales (802,2 mm) medidos durante el año 2010 se encuentran dentro de los intervalos establecidos esta cuenca lechera por Magrin *et al.* (2006). Según la serie histórica anual del período 1961-1990, en la zona norte se presentan límites climáticos comprendidos entre las isohietas de 800 mm de precipitaciones totales anuales en el oeste y 1200 mm de precipitaciones totales anuales en el este, entre las isotermas de temperaturas máximas medias anuales de 24 °C en el

Resultados y Discusión

sur y 26 °C en el norte y entre las isotermas de temperaturas mínimas medias anuales que oscila entre 10 °C y 14 °C.

Además, las temperaturas medias anuales y estacionales decrecen en sentido norte-sur, por su parte, la continentalidad del clima y la frecuencia de heladas aumentan de este a oeste, mientras que, las precipitaciones decrecen en sentido norte-sur (Cabrera y Willink, 1973; Viglizzo *et al.*, 2005).

Por todo esto, la región centro santafesina posee condiciones ambientales propicias para el desarrollo de sistemas de producción intensiva de leche bovina (tambos) durante gran parte del año. Aunque se producen algunos inconvenientes sanitario-productivos durante los veranos caluroso y lluviosos, característicos de esta región (Viglizzo *et al.*, 2005; Herrero y Gil, 2008).

A su vez, los registros de la Estación Agrometeorológica dependiente de EER-INTA Rafaela para los años 2009, 2010 y 2011 reportan temperaturas medias máximas (25,8 °C; 25,0 °C y 24,9 °C), temperaturas medias mínimas (12,3 °C; 11,6 °C y 12,1 °C) y precipitaciones totales anuales (988,7 mm; 802,2 mm y 967,3 mm), similares a los niveles medidos en la región centro santafesina durante el período 1930-2009.

Consecuentemente, el año durante el cual se desarrolló el presente estudio (2010) presenta las características climáticas típicas de la región, y los valores de las variables temperatura (máxima y mínima) y precipitaciones están incluidos en los intervalos establecidos para la serie histórica anual del período 1930-2009.

Debido a que, los veranos lluviosos y muy calurosos de la región centro santafesina parecen afectar la producción láctea bovina y el año 2010 fue un año típico climáticamente, se representaron en forma mensual las temperaturas medias y las

Resultados y Discusión

precipitaciones registradas por la estación agrometeorológica de la EER-INTA (**Figura V.7**). Se puede observar temperaturas máximas superiores a 25 °C en el período comprendido entre los meses de octubre a abril, mientras que durante el período junio-agosto, las temperaturas mínimas resultaron cercanas a los 5 °C. Además, se visualiza que la amplitud térmica mensual (diferencia entre temperatura media máxima y temperatura media mínima) es superior a 10 °C, durante todo el año.

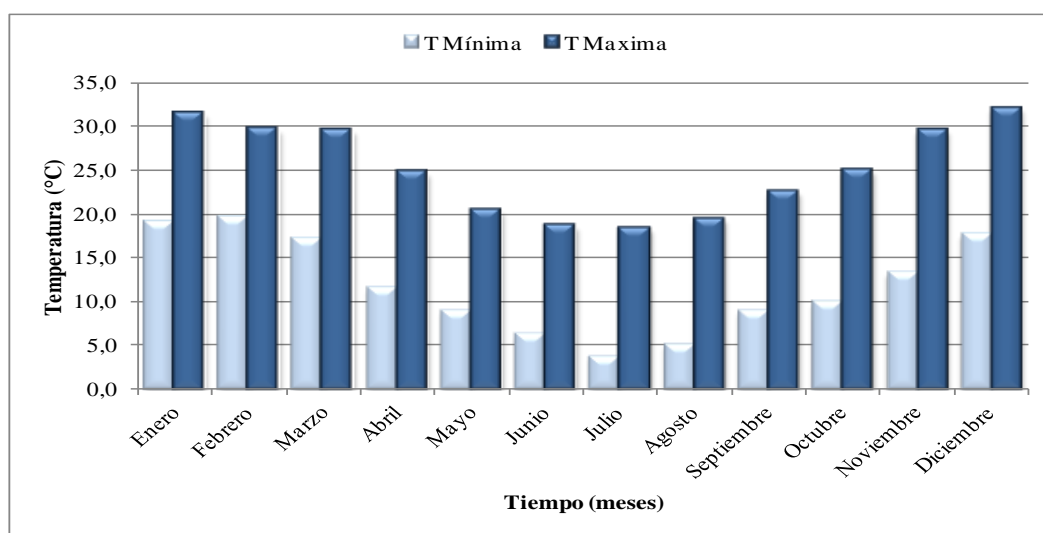


Figura V.7. Temperaturas (°C) máximas y mínimas registradas durante el año 2010 por en la Estación Agrometeorológica dependiente de EER-INTA Rafaela

Se debe tener en cuenta que la temperatura de confort de la vaca lechera se encuentra comprendida entre 5 °C - 25 °C (dependiendo de la humedad relativa ambiental, la radiación solar, los vientos y el color del pelaje). Cuando la temperatura ambiente diurna supera los 27 °C, se produce una falla en los mecanismos de termorregulación, aumentando así la temperatura rectal del animal (Rensis y Scaramuzzi, 2000). De modo que, comienzan a ocurrir cambios fisiológicos tendientes a

Resultados y Discusión

mantener la temperatura corporal dentro de valores normales. Dichos cambios fisiológicos traen aparejado un menor consumo alimenticio, una menor producción lechera, mayores pérdidas reproductivas, una mayor susceptibilidad a las enfermedades como consecuencia de una caída en las defensas inmunitarias, acompañado de un incremento en la prevalencia de mastitis (Valtorta *et al.*, 2002; Castro, 2009).

En lo que respecta a la distribución de las precipitaciones que tuvieron lugar durante el año 2010, se aprecia en **Figura V.8** que los mayores valores de lluvias se produjeron durante los meses de verano (enero, febrero y marzo) y resultaron superiores a los 100 mm/mes. Por el contrario, durante los meses de invierno (junio, julio y agosto) las lluvias resultaron muy bajas con valores inferiores a los 5 mm/mes.

La región centro santafesina tiene precipitaciones de variada intensidad a lo largo del año, que se caracteriza comúnmente por presentar los máximos valores durante los meses de verano, valores intermedios en primavera otoño y mínimos durante el invierno (Schnack *et al.*, 2000).

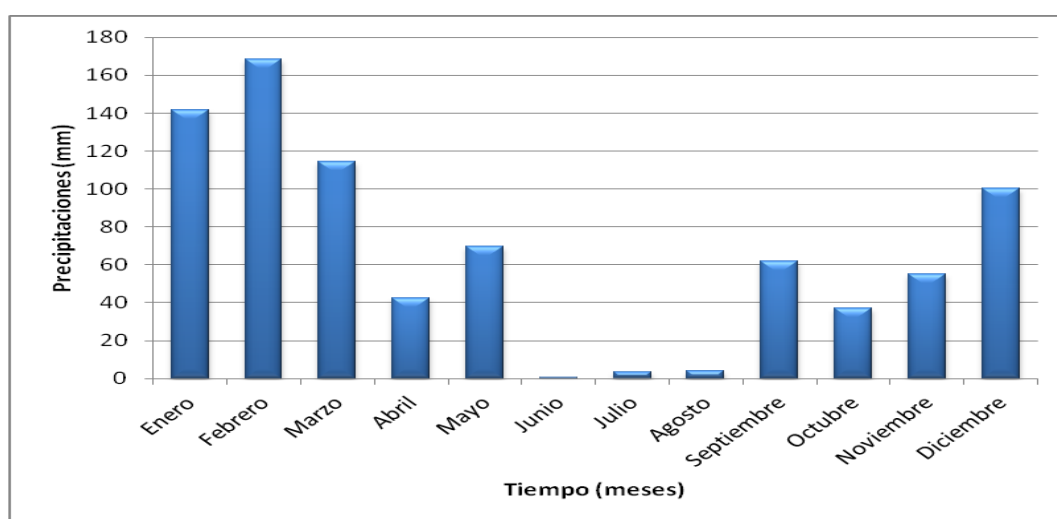


Figura V.8. Precipitaciones (mm) medidas durante el año 2010 en la Estación Agrometeorológica dependiente de EER-INTA Rafaela.

Resultados y Discusión

Según Vilche *et al.* (2011), las precipitaciones mensuales del registro histórico para la serie 1973-2004 en el centro de Santa Fe (Estación meteorológica Zavalla) fueron superiores a 100 mm/mes en los meses de enero febrero y marzo, decreciendo desde abril (97,3 mm) hacia julio (26,1 mm), para incrementar gradualmente desde el mes de agosto (31,8 mm) hasta diciembre (118 mm).

A su vez, según el registro histórico para la serie 1930-2009 de la Estación agrometeorológica del EER-INTA Rafaela, la distribución anual fue elevada durante el verano (118,3 mm en enero, 111,0 mm en febrero y 155,1 mm en marzo), baja en el invierno (29,2 mm en junio, 23,3 mm en julio, 25,4 mm en agosto) con máximos valores que se repiten a final de cada año (104,9 mm en noviembre y 123,8 mm en diciembre).

Por ello y teniendo en cuenta los valores de precipitaciones mensuales registrados en la Estación agrometeorológica del EER-INTA Rafaela durante el año 2010 (**Figura V.8**), se puede establecer que las lluvias que tuvieron lugar en dicho año siguen el comportamiento de distribución anual de lluvias características de la región.

V.3.2. Efecto de las variables climáticas sobre los RCS y RG

Por un lado se debe considerar que la cantidad y la frecuencia de las lluvias afectan al ambiente, modificando su normal equilibrio, el animal y los microorganismos causantes de enfermedades. Es decir, las precipitaciones generan encharcamientos del suelo y barro en los corrales donde se encuentran los animales, característicos de los sistemas productivos de pastoreo con suplementación de los tambos de Argentina.

Resultados y Discusión

Por otro lado, es necesario considerar que los incrementos de temperatura ambiente pueden producir un estrés sobre las vacas acompañado de una mayor susceptibilidad a contraer enfermedades debido a una disminución en las defensas inmunitarias.

Por todo ello, y teniendo en consideración que los niveles de Recuentos de Células Sómicas (RCS) y Recuentos de Gérmenes (RG) de la **Figura V.5** prácticamente acompañaron al comportamiento de las temperaturas ambientales (**Figura V.7**) y de las precipitaciones mensuales (**Figura V.8**), se aplicó la opción stepwise del modelo de regresión lineal múltiple de segundo orden para relacionar los RCS y RGT con las temperaturas y precipitaciones mensuales.

En **Tabla V. 9** se exponen las ecuaciones matemáticas que expresan los cambios en los niveles de RCS y RG con las temperaturas y precipitaciones que tuvieron lugar durante el año 2010.

Tabla V.9. Ecuaciones que representan los efectos de las temperaturas y precipitaciones sobre los Recuentos de Células Somáticas y Recuentos de Gérmenes

Componente	$\text{Log [Y]} = \beta_0 + \beta_1 * T + \beta_2 * P + \beta_{11} * T^2 + \beta_{22} * P^2 + \beta_{12} * T * P$	R
RCS	$\text{Log[RCS]} = 5,02 + 0,0732 * T - 0,0027 * P - 0,0023 * T^2 + 0,00016 * T * P$	90,43
RG	$\text{Log[RG]} = 4,92 + 0,000075 * T * P$	75,33

T: Temperatura media (°C), P: Precipitación (mm), R: Coeficiente de regresión porcentual

Para ambos casos, los ajustes alcanzados mediante el modelo de regresión múltiple fueron adecuados, con coeficientes de regresión del 90,43% para log RCS y del 75,33% para Log RG. A fin de visualizar los efectos de la temperatura y

Resultados y Discusión

precipitaciones sobre las transformaciones logarítmicas de ambas variables se construyó la **Figura V.9**.

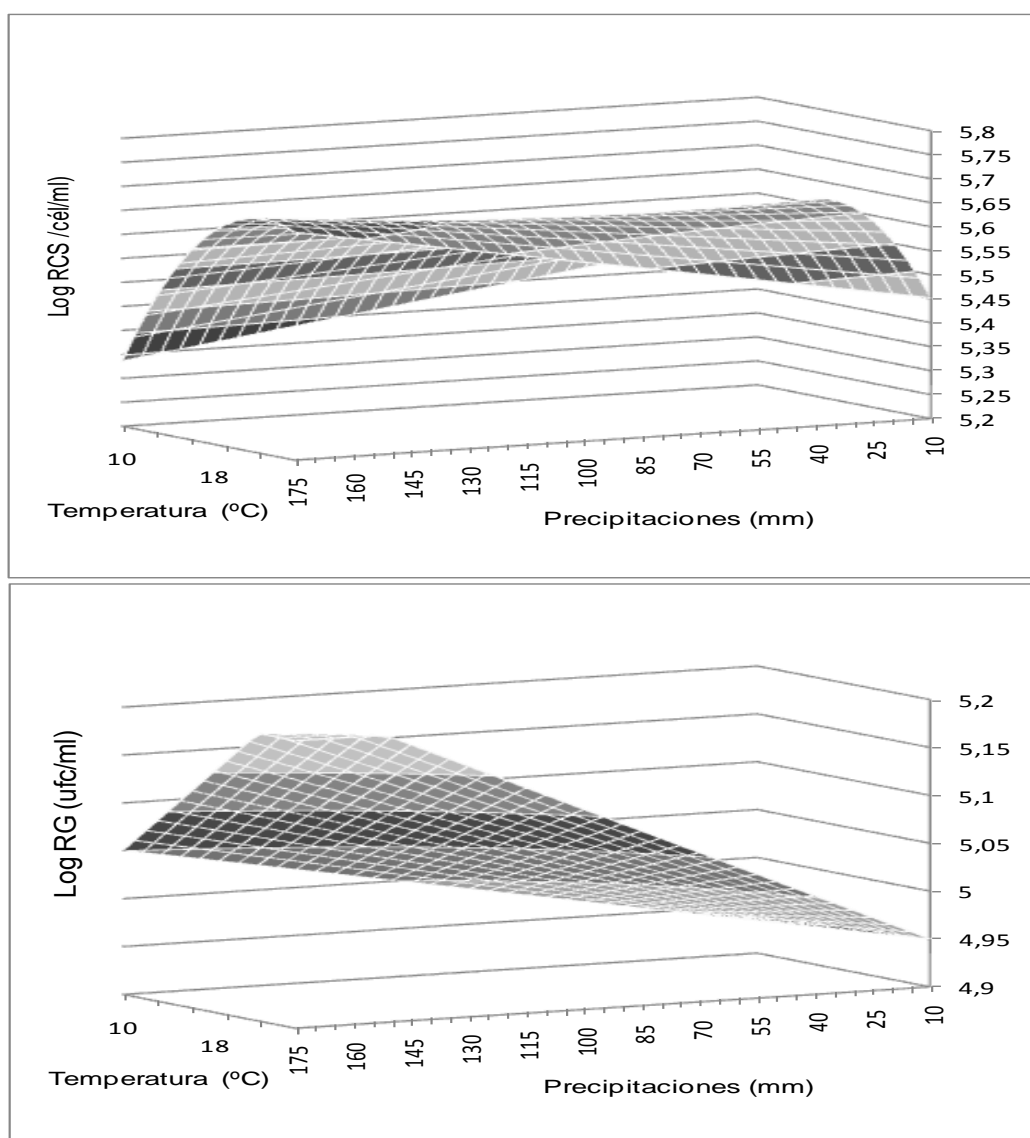


Figura V.9. Efecto de la temperatura y las precipitaciones sobre los RCS y RG

Con respecto a las células somáticas, el modelo consideró significativa la interacción entre precipitaciones y temperatura, por ello el comportamiento de Log RCS resulta complejo. Para elevados valores de temperatura, el incremento de

Resultados y Discusión

precipitaciones produce un aumento en los logaritmos de los RCS, mientras que a bajas temperatura se produce el efecto contrario. Cuando las precipitaciones son elevadas, el incremento de temperatura favorece los aumentos de RCS hasta llegar a estabilizarse por un efecto cuadrático, mientras que a bajas precipitaciones, el efecto cuadrático es más acentuado.

Para los Log RG, la interpretación de la **Figura V.9** resulta más simple, puesto que al haber resultado significativa la interacción entre temperatura y precipitaciones, con signo positivo del parámetro β_{12} , se evidencia que un incremento en cualquiera de las dos variables predictivas produce un aumento en los niveles de Log RG.

Ambas gráficas permiten establecer que durante los meses de verano en la región centro santafesina, con elevados valores de temperaturas y precipitaciones, las transformaciones logarítmicas de los RCS y RG se incrementan.

Al respecto, se debe destacar que algunos autores reportaron que la cantidad y la calidad de leche se ven deteriorada durante los meses del verano, debido al estrés térmico que sufren los animales en esta época. Así, por ejemplo, Cappa (1998), Bernabucci *et al.* (2002), Silanikove *et al.* (2009) y Bernabucci *et al.* (2010) realizaron investigaciones con vacas lecheras de alta producción durante las épocas calurosas, y comprobaron que las altas temperaturas ambientales no solo afectan la cantidad de leche producida (disminución del 10 % en verano) sino que además modifican las características físico-químicas de la leche. Así, se produce una disminución en los valores de pH, una reducción de los porcentajes de grasa, lactosa y proteínas, coagulación y un aumento del contenido de electrolitos y agua. Según un estudio realizado por West *et al.* (2003) en regiones templadas, el contenido de grasa y

Resultados y Discusión

proteínas en leche pueden disminuir (0,4 % y 0,2 %, respectivamente) en el verano con respecto al invierno.

En Italia, Lacetera *et al.* (2005) señalan que la ocurrencia de eventos extremos (olas de calor) durante el verano está asociado con una disminución en la síntesis de ADN en PBMC (células mononucleares de sangre periférica) y mayor cantidad de anticuerpos en la secreción de PBMC en plasma. Este hecho se refleja en una depresión de la inmunidad celular y una mejora en la respuesta humoral. Mientras que, Elvinger *et al.* (1992), Hahn *et al.* (1997), Collier (2006) y Collier *et al.* (2008) en los estados de Florida, Nebraska y Arizona (Estados Unidos) reportaron modificaciones inmunológicas a causa de la hipertermia inducida por el estrés calórico. El efecto principal sobre la función inmune fue la reducción de la migración de leucocitos en la glándula mamaria, dejándola expuesta a la infección por microorganismos tanto de patógenos contagiosos como ambientales.

A su vez, Padgett y Glaser (2003) reportaron que la activación crónica de las respuestas al estrés térmico, que incluyen el eje hipotalámico-hipofisis-adrenal y el eje simpático-adrenal medular, da lugar a la producción crónica de hormonas glucocorticoides y catecolaminas. Los receptores de glucocorticoides de las células inmunitarias se unen al cortisol e interfieren con la regulación de la actividad de las células inmunes productoras de citoquinas y los receptores adrenérgicos se unen a la epinefrina y la norepinefrina activando la transcripción de genes que codifican para una variedad de citoquinas. De este modo, se produce una disminución de la capacidad defensiva de la respuesta del sistema inmunológico.

Resultados y Discusión

Por todo lo anterior expuesto, y teniendo en cuenta que la temperatura máxima, en la región centro santafesina supera el valor límite para el confort bovino (27 °C) hacia finales de la primavera (noviembre y diciembre) y durante el verano (enero-marzo) (**Figura V.7**), se puede suponer que los bovinos de los pequeños tambos de esta región hayan experimentado depresiones en el sistema inmunológico durante la temporada más calurosa del año 2010, aumentando de este modo los riesgos de contraer enfermedades.

Con respecto a las precipitaciones, se debe resaltar que las lluvias intensas al modificar el ambiente, propician el desarrollo de los patógenos ambientales en los lugares en que se encuentran las vacas de ordeño, así como también en los corrales y caminos (Zehner *et al.*, 1986).

En efecto, cuando se cuantifica la actividad microbiana en los suelos (recuentos de microorganismos aerobios mesófilos viables y mohos y levaduras) se observa una tendencia creciente conforme se incrementa el porcentaje de humedad en las muestras de suelo. Así, Ojha y Kostrzynska (2008) cuando incuban suelos a diferentes porcentajes de humedad, señalan que los Log (UFC) de bacterias asciende desde 16.03 hasta 17.89 en la medida que el porcentaje de humedad del suelo se incrementa desde 5.0 % hasta 18.0 %, mientras que los log (UFC) de hongos aumentan desde 10.91 hasta 11.20. Además, en pruebas de respiración con glucosa como medida del efecto de las temperaturas en la actividad microbiana total del suelo, Qureshi *et al.* (2003) encontraron que la tasa más alta de respiración acumulativa ocurrió a 28 °C y decreció conforme la temperatura desciende, con mínima proliferación a 4 °C.

Resultados y Discusión

En Nueva Zelanda, con similitud en el sistema productivo a la cuenca lechera centro santafesina, puesto que los animales se trasladan desde los corrales hacia las salas de ordeño, Lacy-Hubert (2006) señala que la cantidad de estreptococos ambientales presentes los caminos usados por vacas es más elevada en los meses de mayores lluvias. A su vez, Hogan y Smith (2003) reportaron que las tasas de mastitis clínicas en vacas lecheras provocadas por patógenos ambientales son mayores durante períodos de tiempo lluvioso y húmedo, tanto en sistemas de producción estabuladas como en sistemas pastoriles.

Con respecto a las enfermedades podales se debe destacar que, los microorganismos ambientales más prolíferos en épocas lluviosas que pueden afectar a las pezuñas del bovino debilitadas por la humedad son: *Fusobacterium* spp., *Peptostreptococcus indolicus*, *Campylobacter sputorum*, *Bacteroides fragilis* y *Treponema* spp. (Walker *et al.*, 1995; Sprecher *et al.*, 1997; Read *et al.* 1998; Demrikan *et al.*, 1998 y Perusia 2001).

A su vez, en épocas lluviosas aumenta la presencia de microorganismos ambientales que pueden causar mastitis en los corrales bovinos (Hogan y Smith, 2003), tales como: *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus equinus*, *Streptococcus equi*, *Streptococcus parauberis*, *Escherichia* spp., *Klebsiella* spp. y *Enterobacter* spp. que ingresan a la ubre entre los sucesivos ordeños (Phillips, 1996, Costa *et al.*, 1998, Calvihno, 2005).

En consecuencia, las precipitaciones frecuentes e intensas del final de la primavera y típicas del verano en la región centro santafesina de Argentina, aumenta la presencia de patógenos oportunistas en el suelo de los corrales de descanso, caminos y

Resultados y Discusión

en las proximidades de los bebederos - comederos. Este motivo puede ser la causa de los incrementos de los RCS y RG observados en **Figura V.9**.

V.3.3. Efecto de las variables climáticas sobre la frecuencia de antibióticos en la leche

En este trabajo se determinó una estacionalidad en la presencia de inhibidores en leche bovina de los pequeños tambos de la cuenca centro santafesina durante el año 2010, con máximos a fin de primavera y en verano, y con mínimo en invierno (**Figura V.2** y **Figura V.3**). Así mismo, las temperaturas (**Figura V.7**) y las precipitaciones (**Figura V.8**) presentan distribuciones bimodales a lo largo del año 2010, con picos máximos y mínimos que coinciden con los observados para antibióticos. Debido a estas similitudes en las distribuciones, se aplicó la opción stepwise del modelo de regresión logística que relacionan respuestas dicotómicas con variables climáticas.

En **Tabla V.10** se muestran los parámetros estadísticos con su correspondiente valor de significancia. En la misma, se observa que en el caso de las frecuencias de residuos de betalactámicos el parámetro “Precipitaciones” resultó estadísticamente significativo. A su vez, el parámetro “Precipitaciones²” afectó en forma significativa la frecuencia de residuos de tetraciclinas. Mientras que, en lo referido a los sulfamidas fueron “Temperatura” y “Temperatura²” las variables que afectaron su frecuencia.

Así, una vez determinados los parámetros significativos en el modelo de regresión logística se calcularon las ecuaciones matemáticas que representan la asociación entre la presencia de antibióticos en leche y los parámetros significativos durante el año 2010 (**Tabla V.11**).

Resultados y Discusión

Tabla V.10. Parámetros estadísticos obtenidos mediante la aplicación del método de regresión logística a las distribuciones de frecuencia de ATBs en leche en el año 2010

Antibiótico	Variable	Valor χ^2	Valor p
Betalactámicos	Precipitaciones	9,70169	0,0018
	Precipitaciones ²	0,00680	0,9343
	Temperatura	4,99068	0,0255
	Temperatura ²	3,33491	0,0678
	Precipitaciones *Temperatura	0,44988	0,5024
Tetraciclinas	Precipitaciones	0,58592	0,4440
	Precipitaciones ²	6,56672	0,0104
	Temperatura	2,32509	0,1273
	Temperatura ²	2,13179	0,1443
	Precipitaciones *Temperatura	0,66569	0,4146
Sulfamidas	Precipitaciones	0,00771	0,9300
	Precipitaciones ²	0,00449	0,9465
	Temperatura	7,60064	0,0058
	Temperatura ²	6,50233	0,0108
	Precipitaciones *Temperatura	0,01653	0,8977

Tabla V.11. Ecuaciones matemáticas obtenidas mediante el modelo de regresión logístico que expresan las distribuciones de frecuencias de ATBs en leche durante el año 2010

ATBs	$L_{ij} = \beta_0 + \beta_1 P_i + \beta_{11} P_i^2 + \beta_2 T_i + \beta_{22} T_i^2 + \beta_{12} P_i T_i + \varepsilon_{ij}$	Test Bondad Ajuste	
		Valor χ^2	Valor p
BTs	$L_{ij} = -3,90306 + 0,00583 \cdot P$	5,9512	0,1140
TCs	$L_{ij} = -3,61591 + 0,000026 \cdot P^2$	1,9058	0,5922
SAs	$L_{ij} = -10,0017 + 0,58749 \cdot T - 0,01271 \cdot T^2$	2,0376	0,5646

Los tres modelos matemáticos, presentan valores de P superiores a 0,10, razón por la cual los objetos obtenidos mediante este modelo son adecuados (**Tabla V.11**).

Los coeficientes positivos de los términos lineales Precipitaciones (β_1) y Temperatura

Resultados y Discusión

(β_2) de los modelos para betalactámicos (BTs) y sulfamidas (SAs), respectivamente, señalaron que a medida que aumentan las precipitaciones, se incrementan las frecuencias de residuos de betalactámicos; como así también al registrarse elevaciones de temperatura, los resultados positivos a las sulfamidas son mayores.

Además, el signo positivo del término cuadrático de las precipitaciones (β_{11}) en el modelo matemático para las tetraciclinas muestra un incremento en la frecuencia que es mayor en la medida que aumentan las precipitaciones ($\beta_{11} > 0$) especialmente cuando las lluvias superaron los 100 mm.

Finalmente, el signo negativo del coeficiente β_{22} en el modelo, determina una estabilidad de las frecuencias de sulfamidas en leche, conforme se estabiliza temperatura media ambiente.

En **Figura V.10** se visualizan las ecuaciones matemáticas que presentan relaciones entre las frecuencias de resultados positivos estimados y los parámetros significativos en cada antibiótico, junto con la representación puntual de las frecuencias medidas para cada una de estas moléculas.

Los ajustes entre las temperaturas y las precipitaciones con las frecuencias de residuos de antibióticos en las muestras de leche obtenidas en estos pequeños tambos, reflejan una proporcionalidad directa. Lo cual muestra que, cuanto más elevada sean las temperaturas y/o las precipitaciones, aumentarán las probabilidades de encontrar de resultados positivos a la respuesta del método de detección residuos de antibióticos.

Por todo lo anterior, y teniendo en cuenta las condiciones ambientales de la región centro santafesina durante el año 2010 (primavera y verano), se destaca que los períodos calurosos y lluviosos predisponen a la vaca lechera a padecer enfermedades

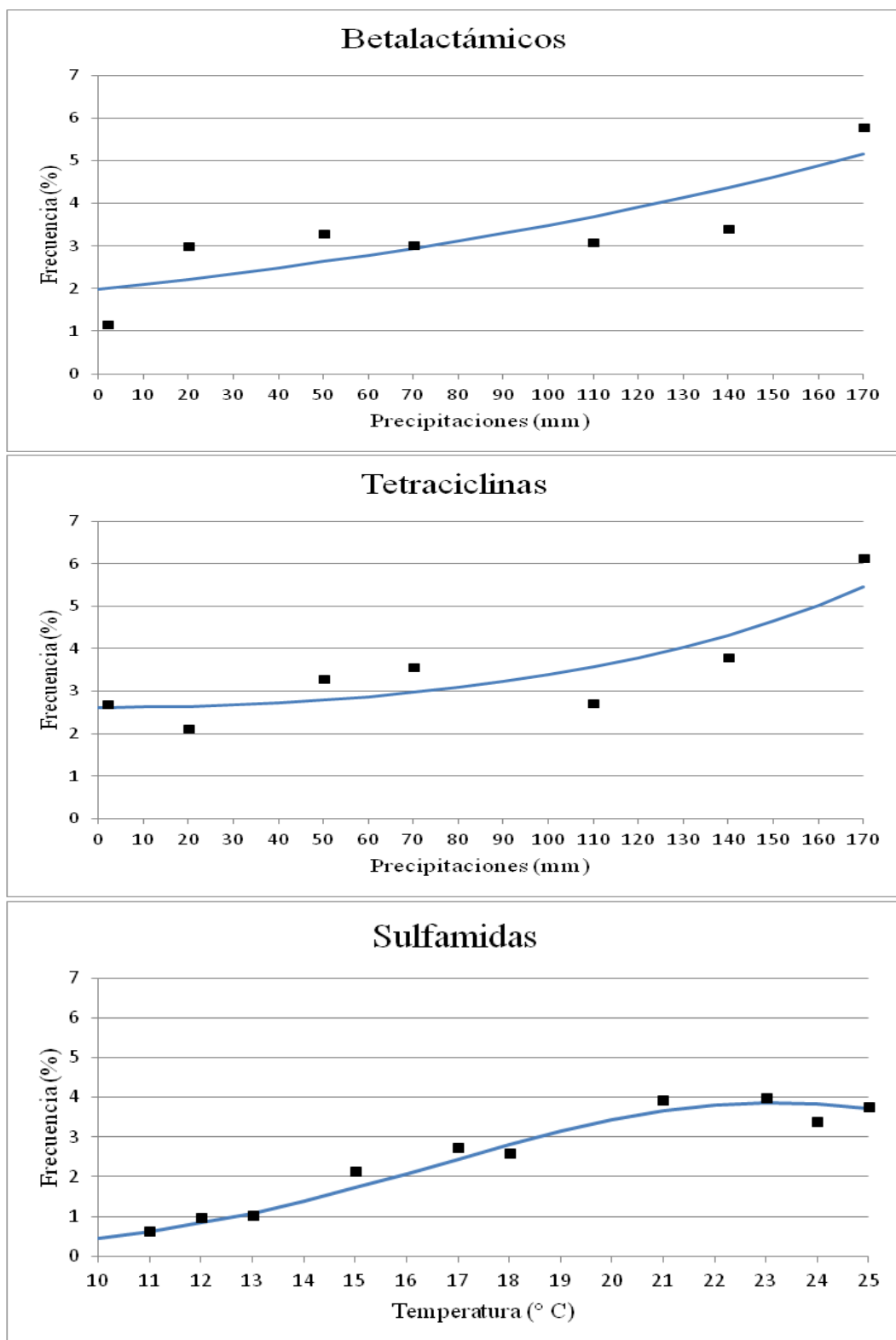


Figura V.10. Efectos de las temperaturas ambientales y/o precipitaciones sobre la probabilidad de detectar residuos de antibióticos en leche.

Resultados y Discusión

por patógenos ambientales. Esto se debe a los efectos conjuntos de estos efectos, porque generan detrimento del sistema inmunológico y predisponen a la proliferación de microorganismos en el ambiente, incrementando de este modo el riesgo de contraer enfermedades infecciosas.

De hecho, se incrementan las infecciones podales e intramamarias debido a microorganismos ambientales, acompañado de un uso estacional de antimicrobianos para sus tratamientos.

Como consecuencia de ello, con el incremento de las enfermedades generadas por microorganismos, se utilizan antibióticos para los tratamientos terapéuticos, motivo por el cual aumenta el riesgo de encontrar estos residuos de medicamentos en leche.

Algunos autores en diferentes países comprobaron la estacionalidad de las mastitis ambientales en veranos calurosos y lluviosos. Así, Makovek y Ruegg (2003) cuando analizan 77.172 muestras de leche procedentes de vacas que se encuentran en tambos estabulados de Wisconsin (USA), reportaron un 5,2 % de Coliformes y un 12,2 % de Estreptococos ambientales. Dichos autores señalan que las frecuencias son mayores en los meses de verano que en el invierno.

En forma similar, Olesen *et al.* (1985) en Dinamarca; Supek (1995) en Hungría; Miltenburg *et al.* (1996) y Elbers *et al.* (1998) en Holanda; Waage *et al.* (1998) en Noruega; Bradley *et al.* (2002) en Reino Unido; Burvenich *et al.* (2003) en Bélgica; Gasqui *et al.* (2003), Seegers *et al.* (2003) y Robert *et al.* (2005) en Francia; Hospido y Sonesson (2005) en España; Vasil (2007) en Eslovaquia y Sharma *et al.* (2011) en India, reportan estacionalidad de la incidencia de mastitis ambientales durante los meses de veranos calurosos y húmedos.

Resultados y Discusión

En Estados Unidos, Smith y Hogan (1993), Todhunter *et al.* (1995), Hogan y Smith (2003) y Oliver *et al.* (2011) informaron de la estacionalidad de las mastitis ambientales, causadas principalmente por coliformes en las temporadas de lluvias intensas.

En América latina, varios autores señalaron presencia de mastitis ambientales por *Estreptococos* en veranos caluroso y lluviosos como Costa *et al.* (1998) en Brasil, Andresen (2001) en Perú, Desmoures y Repetti (2006) en Argentina, Calderón y Rodríguez (2008) en Colombia y Pastor y Bedolla (2008) en México.

Por todo ello, durante los meses de elevadas temperaturas y precipitaciones se verían incrementadas las infecciones del ganado bovino y en consecuencia el uso de antibióticos. Con lo cual, esta época del año, debe coincidir, no solo con mayores controles de la leche entregada a la industria láctea, sino, fundamentalmente, con estrategias de prevención orientadas a la atenuación de los efectos perjudiciales que las condiciones ambientales tienen en los animales.

Así por ejemplo, con el propósito de atenuar el efecto de los veranos calurosos sobre la calidad de la leche y la producción láctea, diversos autores proponen el incremento de espacios de sombras tanto naturales como artificiales en los tambos (Collier y Beede, 1985, Valtorta *et al.*, 1996, Calamari *et al.*, 1997, Cappa, 1998, Bernabucci *et al.*, 2002, West *et al.*, 2003, Collier *et al.*, 2006, Silanikove *et al.*, 2009, Bernabucci *et al.*, 2010,). En este sentido sería interesante llevar a cabo estudios que evalúen la frecuencia de aparición de residuos de antibióticos en la leche de vacas con diferentes niveles de sombras durante los meses de verano.

VI. CONCLUSIONES

De los resultados de este trabajo se deducen una serie de conclusiones respecto la presencia de antibióticos en leche procedente de los pequeños tambos de la región centro-santafesina, que se detallan a continuación:

- ✓ Las frecuencias promedio anuales de betalactámicos (BTs), tetraciclinas (TCs) y sulfamidas (SAs) en leche fueron de 3,02 %, 3,23 % y 2,42 %, respectivamente.
- ✓ Los antibióticos en leche mostraron marcada estacionalidad con máximos a finales de verano (BTs 6,2 %, TCs 6,0 % y SAs 4,0 %) y de primavera (BTs 4,0 %, TCs 3,8 % y SAs 4,0 %) y mínimos en invierno (BTs 1,0 %, TCs 2,0 % y SAs 0,8 %).
- ✓ Las mayores frecuencias de muestras de leche con residuos de tetraciclinas presentaron elevados recuentos de células somáticas, según el modelo de regresión logística.
- ✓ Las temperaturas y precipitaciones mostraron un efecto significativo ($p < 0,05$) sobre los recuentos de células somáticas y los recuentos de gérmenes. En efecto, ambos recuentos se incrementan durante las temporadas calurosas y lluviosas de esta región.
- ✓ Las frecuencias de residuos de betalactámicos, tetraciclinas y sulfamidas aumentan en las épocas del año con mayores precipitaciones y altas temperaturas.

Conclusiones

Estos factores ambientales extremos tienen un efecto negativo sobre el confort del ganado bovino, pudiendo ocasionar mastitis ambientales que tendrían una repercusión negativa sobre la calidad higienico-sanitaria de la leche. Como consecuencia de ello, se incrementarían los riesgos de aparición de residuos de antibióticos en la leche.

En un futuro, sería interesante llevar a cabo nuevos estudios que analicen los riesgos de encontrar residuos de antibióticos en la leche procedente de pequeños medianos y grandes tambos de otras cuencas lácteas del país, a fin de implementar estrategias para su control, que permitan disminuir sus frecuencias; tales como análisis de riesgos y puntos críticos en cada explotación ganadera, implementación de protocolos de buenas prácticas ganaderas, etc.

De esta forma, se puede disminuir las frecuencias de antibióticos en la leche, garantizando su inocuidad desde el propio tambo, a fin de evitar los problemas que estas moléculas ocasionan a la industria láctea y la salud pública.

VII. BIBLIOGRAFIA

1. ABEBEW, D. S. (2008). Detection and determination of oxytetracycline and penicillin g antibiotic residue levels in bovine bulk milk from debrezeit and nazareth dairy farms. Tesis Maestria. Veterinary Science (Tropical Veterinary Public Health). Faculty of Veterinary Medicine, Addis Ababa University, Ethiopia. 99 p.
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. ADESIYUN, A.; STOUTEA, S. y DAVIDA, B. (2007). Preprocessed bovine milk quality in Trinidad: Prevalence and characteristics of bacterial pathogens and occurrence of antimicrobial residues in milk from collection centres. *Food Control*, 18: 312-320.
5. ADETUNJI, V. O. (2011). Effects of Processing on Antibiotic Residues (Streptomycin, Penicillin-G and Tetracycline) in Soft Cheese and Yoghurt Processing Lines. *Pakistan Journal of Nutrition*, 10 (8): 792-795.
6. ALBRIGHT, J. L.; TUCKEY, S. L. y WOODS, G. T. (1961). Review: Antibiotics in Milk. *Journal of Dairy Science*. 44 (5): 779-807.
7. ANDERSON, K. L.; MOATS, W. A.; RUSHING, J. E. y O'CARROLL, J. M. (1998). Detection of milk antibiotic residues by use of screening test and liquid chromatography after intramammary administration of amoxicillin or penicillin G in cows with clinical mastitis. *American Journal of Veterinary Research*, 59: 1096-1100.
8. ANDRESEN, S. H. (2001). Mastitis: prevención y Control. *Revista investigación Veterinaria de Perú*. 12 (2): 55-64.
9. AKERLIND, M.; HOLTENIUSB, K.; BERTILSSONA, J. y EMANUELSONC, M. (1999). Milk composition and feed intake in dairy cows selected for high or low milk fat percentage. *Livestock Production Science*, 59: 1-11.

Bibliografía

10. ALTHAUS, R.; MOLINA, M. P.; RODRÍGUEZ, M. y FERNÁNDEZ, N. (2001). Evaluation of the BRT method for detection of β -lactams antibiotics in ewe milk. *Milchwissenschaft*, 56 (10): 568-572.
11. ALTHAUS, R.; MOLINA, P.; MOLINA, A.; TORRES, A. y FERNANDEZ, N. (2002). Detection Limits of Antimicrobial Agents in Ewe Milk by Delvotest[®] Test. *Milchwissenschaft*, 57: 660-664.
12. ALTHAUS, R.; TORRES, A.; MONTERO, A.; BALACH, S. y MOLINA, M. P. (2003). Detection Limits of Antimicrobials in Ewe Milk by Delvotest[®] Photometric Measurements. *Journal of Dairy Science*, 86: 457-463.
13. ALTHAUS, R. L.; BERRUGA, M. I.; MOLINA, A.; BELTRA, M. C. y MOLINA, M. P. (2007). BRT AiM[®] Inhibitor test for determining the occurrence of antibiotic residues in ewe milk. *Milchwissenschaft*, 62 (2): 202-204.
14. 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.
15. BANDO, E.; OLIVEIRA, R.; FERREIRA, G. y MACHINSKI, M. (2009). Occurrence of antimicrobial residues in pasteurized milk commercialized in the state of Paraná, Brazil. *Journal of Food Protection*, 72(4): 911-914.
16. BAYNES, R.E.; LYMAN, R.; ANDERSON, K.L. y BROWNIE, C.F. (1999). A Preliminary Survey of Antibiotic Residues and Viable Bacteria in Milk from Three Caribbean Basin Countries. *Journal of Food Protection*, 62 (2): 177-180.
17. BELIC, B.; CINCOVIĆ, M. R.; DAVIDOV, I.; LAKO, B.; POTKONJAK, A. y STANČIĆ, I. (2012). Periparturient hemological finding in dairy cows with uterus and udder inflammation. *Contemporary Agriculture*. 61 (1-2): 112-118.
18. BERNABUCCI, U.; LACETERA, N.; RONCHI, B. y NARDONE, A. (2002). Effects of the hot season on milk protein fractions in Holstein cows. *Animal Research*, 51: 25–33.
19. BERNABUCCI, U.; LACETERA, N.; BAUMGARD, L. H.; RHOADS, R. P.; RONCHI, B. y NARDONE, A. (2010). Metabolic and hormonal acclimation to heat stress in domestic ruminants. *Animal Research*, 4:1167-1183.

Bibliografía

20. BERRUGA, M. I.; MOLINA, M. P.; NOVES, B.; ROMAN, M. y 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.
21. BISHOP, J. y WHITE, C. (1984). Antibiotic residue detection in milk. A review. *Journal of Food Protection*. 47: 647-652.
22. BLACKWELL, P. A.; Kay, P. y Boxall, A. B. A. (2007). The dissipation and transport of veterinary antibiotics in a sandy loam soil. *Chemosphere*. 67 (2): 292–299.
23. BLOOD, D. C. y RADOSTITS, O.M. (1992). *Medicina Veterinaria*. 7º ed. Interamericana. Mc Graw-Hill. Vol: 1. 851 p.
24. BONFOH, B.; DEM, S.; KEITA, O.; DELORENZI, S.; TRAORE, H.; SIMBE, C. F.; ALFAROUKH, I. O.; FARAH, Z.; NICOLET J. y ZINSSTAG J. (2003). Assessment of antibiotic residues by microbial inhibitor tests in fresh cow milk sold in Bamako (Mali). *Milchwissenschaft*, 58 (5-6): 304-307.
25. BOOTH, J. M. y HARDING, F. (1986). Testing for antibiotic residues in milk. *Veterinary Research*, 238: 565-569.
26. BRADLEY, A. J. (2002). Bovine Mastitis: An Evolving Disease. *The Veterinary Journal*. 164 (2): 116–128.
27. BRADLEY, A. J. y GREEN, M. D. (2009). Factors affecting cure when treating bovine clinical mastitis with cephalosporin-based intramammary preparations. *Journal of Dairy Science*, 92: 1941-1953.
28. BRADY, M. S. y KATZ, S. E. 1988. Antibiotic/antimicrobial residues in milk. *Journal of Food Protection*, 51(1): 8-11.
29. BROUILLET, P. (1994). Maitrise de la présence d'inhibiteurs dans le lait. *Recl. Méd. Vét. Ec. Alfort*. 170 (6/7): 443-455.
30. BRUGUERAS, M. y GARCÍA, M. (1998). Antibacterianos de Acción Sistémica. Parte II. Otros Grupos de Antibióticos. *Revista Cubana Medicina Genética Integrada*, 14(4): 362-373.
31. BURNEVICH, C.; VAN MERRIS, V.; MEHRZAD, J.; DIEZ-FRAILE, A. y DUCHATEAU, L. (2003). Severity of *Escherichia coli* mastitis is mainly determined by cow factors. *Veterinary Research*, 34(5): 521-564.

Bibliografía

32. CABRERA, A. L. y WILLINK A. (1973). Biogeografía de América Latina. Serie Biológica 13. OEA, Washington, D.C., EE. UU. 117 p.
33. CACCAMO, M.; VEERKAMP, R. F.; LICITRA, G.; PETRIGLIERI, R.; LA TERRA, F.; POZZEBON, A. Y FERGUSON, J. D. (2012). association of total-mixed-ration chemical composition with milk, fat, and protein yield lactation curves at the individual level. *Journal of Dairy Science*, 95: 6171–6183.
34. CAI, T.Q.; WESTON, P.G.; LUND, L.A.; BRODIE, B.; MCKENNA, D.J. y WAGNER, W.C. (1994). Association between neutrophil functions and periparturient disorders in cows. *American Journal of Veterinary Research*, 55(7): 934-943.
35. CALAMARI, L.; CALEGARI, F.; MAIANTI, M.G. y STEFANINI, L. (1997). Ventilation and sprinkling during summer period. Effects on metabolic conditions and on some milk characteristics [dairy cows - Emilia Romagna]. *Atti della Associazione Scientifica di Produzione Animale*, 12: 193-194.
36. CALCEDO, V. (2002). Nota preliminar sobre los cambios estacionales de la producción y la riqueza de composición de la leche de vaca en España. *Estudios Agrosociales y Pesqueros*, 192: 223-239.
37. 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.
38. CALDERÓN, A. y RODRÍGUEZ, V. (2008). Prevalencia de mastitis bovina y su etiología infecciosa en sistemas especializados en producción de leche en el altiplano cundiboyacense (Colombia). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 21 (4): 582-589.
39. CALVINHO, L.F.; VITULICH, C.; ZURBRIGGEN, M.; CANAVESIO, V.R. y TARABLA, H.D. (1991). Prevalencia de microorganismos patógenos de la ubre en rodeos de la cuenca lechera santafesina. *Therios*, 18: 188-196.
40. CALVINHO, L.F. (1999). El control de mastitis causadas por *Stafilococcus aureus* a través de la segregación, Chacra y Campo moderno, suplemento tambo. 828: 10-11.
41. CALVINHO, L.F. y TIRANTE, L. (2005). Prevalencia de microorganismos patógenos de mastitis bovina y evolución del estado de salud de la glándula mamaria en Argentina en los últimos 25 años. *Revista FAVE Sección Ciencias Veterinaria* 4: 29-40.

Bibliografía

42. CALVINHO, L. (2007). Terapia en Mastitis Causadas por *Staphylococcus aureus*. *IdiaXXI*. 9: 174-179.
43. CAMACHO DÍAZ, L. M.; CIPRIANO SALAZAR, M.; CRUZ LAGUNAS, B.; GUTIÉRREZ SEGURA, I.; HERNÁNDEZ RUIZ, P.; PEÑALOZA CORTEZ, I. y NAMBO MARTÍNEZ, O. (2010). Residuos de antibióticos en leche cruda comercializada en la región Tierra Caliente, de Guerrero, México. *Revista electrónica de Veterinaria*, 11 (02): 1-11.
44. CANCHO GRANDE, B.; GARCÍA FALCÓN, M. S. y SIMAL GÁNDARA, J. (2000). The use of antibiotics in animal feeds: an actual perspective. *Ciencia y Tecnología de los Alimentos*, 3 (1): 39-47.
45. CAPP, V. (1998). Dairy cows milk yield and quality in hot climate conditions. *Zootecnica e Nutrizione Animale*, 24 (6): 233-238.
46. CASELLA, A. 2005. Neumonía, enfermedad respiratoria bovina (ERB). Informe Técnico 1 y 2, Elanco Animal Health., Bs.As. 7p.
47. CASTRO, S. (2009). El calor y la mastitis. *Producir XXI*, 18 (218): 10-18.
48. CEE (Comunidad Económica Europea). (2001). Directive 2001/82/EC of the european parliament and of the council of 6 November 2001. *Official Journal of the European Communities L 311*: 1-66.
49. CEE (Comunidad Económica Europea). (2002). Decisión 2002/657/CEE 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. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 73: 30-31.
50. CEE (Comunidad Económica Europea). (2010). Decisión 2010/37/CE del consejo del 27 de noviembre de 2009 sobre el Año Europeo de las Actividades de Voluntariado que Fomenten una Ciudadanía Activa. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 17: 43-49.
51. CÓDIGO ALIMENTARIO ARGENTINO (CAA). (2011). Capítulo VIII. Alimentos lácteos. Actualización al 10-06.
52. CODEX ALIMENTARIUS, (1996). Residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos.

Bibliografía

53. 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.
54. COLLIER, R. y BEEDE, D. (1985). Thermal stress as a factor associated with nutrient requirements and interrelationships. En: Nutrition of grazing ruminants in warm climates, McDowell, L.R. (ed.).- Orlando, Florida. (USA): Academic Press, 59-71.
55. COLLIER, R.; DAHL, G. y VANBAALE, M. 2006. Major Advances Associated with Environmental Effects on Dairy Cattle. Journal of Dairy Science, 89 (4): 1244–1253.
56. COLLIER, R.; COLLIER, J.; RHOADS, R. y BAUMGARD L. (2008). Invited Review: Genes Involved in the Bovine Heat Stress Response. Journal of Dairy Science, 91 (2): 445–454.
57. CORDIÉS JACKSON, L.; MACHADO REYES, L. y HAMILTON CORDIÉS, M. (1998). Principios generales de la terapéutica antimicrobiana. Acta Médica. 8 (1): 13-27.
58. COSTA, E. O.; RIBEIRO, A. R.; WATANABE, E. T. y MELVILLE, P. A. (1998). Infectious bovine mastitis caused by environmental organisms. Journal of Veterinary Medicine Series B, 45: 65-71.
59. COSTA, M.; GARCÍA, L. YUNUS A. S.; ROCKEMANNB, D. D.; SAMAL, S. K. y CRISTINA, J. (2000). Bovine respiratory syncytial virus: first serological evidence in Uruguay. Veterinary Research, 31: 241–246.
60. CREA. (2011). Informe Lechero N°77, Edición Especial. AACREA. Disponible en: <http://www.redcrea.org.ar/aacrea/site/PortalInstitucional-internet/ServiciosInformacion/indice.html>
61. CURSACK, A. M.; CASTIGNANI, M. I.; OSAN, O. y CASTIGNANI, H. (2010). Función de Producción en Sistemas Lecheros de Alta Producción de la Cuenca Central Santafesina, Argentina. 11° Congreso Panamericano de la Leche. FEPALE. Bello Horizonte, Brasil: 1-5.
62. DALTON, J. C. (2006). Antibiotic residue prevention in milk and dairy beef. Western Dairy News, 6 (4): W79-W80.

Bibliografía

63. DEBACKERE, M. (1995). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antimicrobial in relation to their residues in milk. Proceeding Symposium Residues of Antimicrobial Drugs and other inhibitors in milk. Kiel, 28-31 August.
64. DEMIRKAN, I.; CARTER, S.D; MURRAY, R.D; BLOWEY, R.W y WOODWARD, M.J. (1998). The frequent detection of treponeme in bovine digital dermatitis by immunocytochemistry and polymerase chain reaction. *Veterinary Microbiology*, 60: 2-4, 285-292
65. DEL PRATO O. S. (1997). Gli inibenti nel latte e i loro effetti sulle trasformazioni casearie. *Il Latte*, 22 (7): 40-48.
66. DEMOLY, P. y ROMANO, A. (2005). Update on Beta-lactam allergy diagnosis. *Current Allergy and Asthma Reports*, 5 (1): 9-14.
67. DESMOURES, P. y REPETTI, O. (2006). Mastitis ambientales. *Producir XXI*, 15(181): 14-18.
68. DE VliegHER, S.; FOX, L. K.; PIEPERS, S.; MCDougALL, S. y BARKEMA, H. W. (2012). Invited review: mastitis in dairy heifers: nature of the disease, potential impact, prevention, and control. *Journal of Dairy Science*, 95: 1025–1040.
69. DHALIWAL, G.S.; MURRAY, R.D. y WOLDEHIWET, Z. (2001). Some aspects of immunology of the bovine uterus related to treatments of endometritis. *Animal Reproduction Sciences*, 67(3-4): 135-52.
70. DIEZ, P. Y CALDERÓN, V. (1997). Empleo de antibióticos en veterinaria. *Revista Española Quimioterapia*, 10: 275-280.
71. DISERENS, J.; BECK HENZELIN, A.; LE BRETON, M. y SAVOY PERROUD, M. (2010). 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. 186 p.
72. DOAN, F.J. (1956). Antibiotics in Milk from Farms. *Journal of Dairy Science*, 1766-1767.
73. EDDER, P.; COPPEX, L.; COMINOLI, A. y CORVI, C. (2002). Analysis of erythromycin and oleandomycin residues in food by high-performance liquid

Bibliografía

chromatography with fluorometric detection- Food Additives and Contaminants- ISSN 0265-203X.

74. ELBERS, A.R.W.; MILTENBURG, J.D.; LANGE, D. DE; CRAUWELS, A.P.P.; BARKEMA, H.W. y SCHUKKEN, Y.H. (1998). Risk factors for clinical mastitis in a random sample of dairy herds from the southern part of The Netherlands. *Journal of Dairy Science*, 81(2): 420-426.

75. ELVINGER, F.; NATZKE, R. y HANSEN, P. (1992). Interactions of Heat Stress and Bovine Somatotropin Affecting Physiology and Immunology of Lactating Cows. *Journal of Dairy Science*, 75 (2): 449–462.

76. EMBRAPA. (1997). Embrapa gado de leite. Manual Técnico – Trabalhador na bovinocultura de leite. 271 p.

77. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). 2010. Dirección de Estadísticas. Production de produits alimentaires et agricoles. Productos por Región. Productos por Región. Disponible en: <http://faostat.fao.org/DesktopDefault.aspx?pageid=339&country=9&lang=es>.

78. FDA (2003). Annual report USA. Food and Drug Administration. En: ZORRAQUINO LOZANO, M.; BERRUGA FERNÁNDEZ; M. y MOLINA PONS, M. (2007). Investigación de campo, de los antibióticos (principio active/formulación) utilizados en vacuno de leche en España y patología tratada. Universitat Politècnica de València.

79. FARIA REYES, J.; GARCIA URDANETA, A.; IZQUIERDO CORSER, P.; ALLARA CAGNASSO, M. y VALERA LEAL, K. (2002). Aislamiento de bacterias gram positivas de leche cruda con residuos de antimicrobianos. *ALAN*. 52 (1): 68-73.

80. FAVV (2003). Annual report, Federaal Agentschap voor de Veiligheid van de Voedselketen. En: ZORRAQUINO LOZANO, M.; BERRUGA FERNÁNDEZ; M. y MOLINA PONS, M. (2007). Investigación de campo, de los antibióticos (principio active/formulación) utilizados en vacuno de leche en España y patología tratada. Universitat Politècnica de València.

81. FENEROVA, J.; ANGELOVA, T. y KRASTANOV, Z. (2008). Correlations between the number of somatic cells and some components of the milk content of the cows of the black-and-white breed. *Journal of Animal Science*, 45 (4): 109-113.

Bibliografía

82. FOUZ, R.; YUS, E.; SANJUÁN, M. y DIÉGUEZ, F. (2010). Statistical evaluation of somatic cell counts in bovine milk at calving, during lactation and at drying-off (by official recording). *Livestock Science*, 128: 185–188.
83. GASQUI, P.; COULON, J.B. y PONS, O. (2003). An individual modelling tool for within and between lactation consecutive cases of clinical mastitis in the dairy cow: an approach based on a survival model. *Veterinary Research*, 34(1): 85-104.
84. GHIDINI, S.; ZANARDI, E.; VARISCO, G. y CHIZZOLINI, R. (2003). Residues of β -lactam antibiotics in bovine milk: confirmatory analysis by liquid chromatography tandem mass spectrometry after microbial assay screening. *Food Additives & Contaminants*, 20: 528-534.
85. GIRAFFA, G. (2004). Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. *FEMS Microbiology Reviews*, 28: 251–260.
86. 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.
87. GOURSAND, L. (1991). Composición y propiedades fisico-químicas en Leche y productos lácteos: vaca-oveja-cabra. 1-92 p. Ed. Acribia. S.A. Zaragoza.
88. GREEN, M. J.; BRADLEY, A. J.; NEWTON, H. y BROWNE, W. J. (2006). Seasonal variation of somatic cell counts of bulk milk in dairy herds in the UK: Research on the origin of summer. *Preventive Veterinary Medicine*, 74 (4): 293-308.
89. GUARD, C. (1985). Pneumothorax after parturition in a cow. *The Compendium on continuing education for the practicing veterinarian*, 7 (3): S191-S194.
90. GUERRERO, D. M.; Motta, R. G.; Gamarra, G. B.; Benavides, E. R.; Roque, M. y Salazar, M. E. (2009). Detección de residuos de antibióticos β -lactámicos y tetraciclinas en leche cruda comercializada en el callao. *Ciencia e Investigación*, 12 (2): 79-82.
91. GUSTAFSON, R.H. y BOWEN, R.E. (1997). The use of antibiotics in animal production. *Journal of Applied Microbiology*, 83 (5): 531-541.
92. HAHN, G. (1997). Dynamic responses of cattle to thermal heat loads. *Journal of Animal Science*, 77: 10-20.
93. HARMON, R. J. (1994). Fisiología de la mastitis y los factores que afectan a los recuentos de células somáticas. *Journal of Dairy Science*, 77: 2103-2112.

Bibliografía

94. HERRERO, M. A. y GIL, S. B. (2008). Consideraciones ambientales de la intensificación en producción animal. Asociación Argentina de Ecología. *Ecología Austral*, 18:273-289.
95. HOGAN, J. y SMITH, K. L. (2003). Coliform mastitis. *Veterinary Research*, 34: 507–519.
96. HORIE, M. (1995). Chemical analysis of macrolide antibiotics. *Chemical Analysis for Antibiotics Used in Agriculture*. AOAC International. Arlington. USA. 165-205 p.
97. HOSPIDO, A. y SONESSON, U. (2005). The environmental impact of mastitis: a case study of dairy herds. *Science of The Total Environment*, 343 (1–3): 71–82.
98. HRISTOV, S.; RELIC, R.,; VUKOVIC, D.; STANKOVIC, B.; JOKSIMOVIC-TODOROVIC, M.; DAVIDOVIC, V. y GAVRIC, B. (2006). Relation between bulk tank milk somatic cell count, milk proteins and fat content, and major mastitis pathogens isolation. *Biotechnology in animal husbandry*, 22: 749-760.
99. INGVARTSEN, K. L.; DEWHURSTB, R. J. y FRIGGENSA, N.C. (2003). On the relationship between lactational performance and health: is it yield or metabolic imbalance that cause production diseases in dairy cattle? A position paper. *Livestock Production Science*, 83: 277–308.
100. INSTITUTO NICARAGÜENSE DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA (INTA) (2010). Manejo Sanitario Eficiente del Ganado Bovino: Principales Enfermedades. Programa Especial para la Seguridad Alimentaria, Nicaragua. Comercial 3H. 50 p.
101. JONES, G. M. y SEYMOUR, E. H. (1988). Cowside antibiotic residue testing. *Journal of Dairy Science*, 71: 1691- 1699.
102. KANG'ETHE, E.K.; ABOGE, G.O.; ARIMI, S.M.; KANJA, L.W.; OMORE, A.O. y MCDERMOTT, J.J. (2005). Investigation of the risk of consuming marketed milk with antimicrobial residues in Kenya. *Food Control*, 16: 349-355.
103. KAYA, S. E. y FILAZI, A. (2010). Determination of Antibiotic Residues in Milk Samples. *Journal of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Kafkas, Kars*, 16 (A): S31-S35.
104. KEMPER, N. (2008). Review: Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecological indicators*, 8: 1-13.

Bibliografía

- 105.KHAN, S. A.; NAWAZ, M. S.; KHAN, A. A.; STEELE, R. S. y CERNIGLIA, C. E. (2000). Characterization of erythromycin-resistant methylase genes from multiple antibiotic resistant *Staphylococcus* spp. Isolated from milk samples of lactating cows. *Am. Journal Veterinary Research*, 61: 1128–1132.
- 106.KHASKHELI, M.; MALIK, R.; ARAIN, M.; SOOMRO, A. y ARAIN, A. (2008). Detection of β – Lactam Antibiotic Residues in Market Milk. *Pakistan Journal of Nutrition*, 7 (5): 682-685.
- 107.KOSIKOWSKY, F.V.; HENNINGSON, R.W. y SILVERMAN, G.J. (1952). The Incidence of Antibiotics, Sulfa Drugs and Quaternary Ammonium Compounds in the Fluid Milk Supply of New York State. *Journal of Dairy Science*, 35 (6): 533–539.
- 108.KRESS, C.; SEIDLER, C.; KERP, B.; SCHNEIDER, E. y USLEBER, E. (2007). Experiences with an identification and quantification program for inhibitor-positive milk samples. *Analytica Chimica*, 586: 257-279.
- 109.LACELLI, W.; MANCUSO, E.; SCHILDER, A.; ARZUBI, A.; TERÁN, J. C.; COMERÓN, E.; TAVERNA, M.; DEL CASTILLO, N. y MACEIRA, J. (2006). Creación y Distribución de Valor en la Cadena Láctea. Eslabón Primario. Provincias de Buenos Aires, Córdoba, Entre Ríos, La Pampa y Santa Fe. Fundación Argentina – Consejo Federal de Inversiones. 217 p.
- 110.LACETERA, N.; BERNABUCCI, U.; SCALIA, D.; RONCHI, B.; KUZMINSKY, G. y NARDONE, A. (2005). Lymphocyte functions in dairy cows in hot environment. *International Journal of Biometeorology*, 50: 105–110.
- 111.LACY-HUBERT, J. (2006). Ecology of *Streptococcus uberis* in a pasture-based dairying system. NMC 45th Annual Meeting Proceedings, Tampa, Florida. January: 22-25.
- 112.LANDICHO, E.F. (2002). Antibiotic resistance in agriculture and medicine: ways of control. Summary. University Library, University of the Philippines at Los Baños (Philippines) UPLB 27p.
- 113.LARRIESTRA, A. y VISSIO, C. (2012). Mastitis: pérdidas económicas, frecuencia y variantes de la enfermedad. ¿cuántos \$\$ se lleva la mastitis? *Producir XXI*, 20(249): 28-32.

Bibliografía

114. LEITNER, G.; JACOBY, S. y SILANIKOVE, N. (2011). An evaluation of casein hydrolyzate in combination with antibiotic for bacterial cure and subsequent increase in milk yield in dairy cows. *BMC Veterinary Research*, 7 (3): 1-8.
115. LINAGE, B.; GONZALO, C.; CARRIEDO, J.; ASENSIO, J.; BLANCO, M.; DE LA FUENTE, L. y SAN PRIMITIVO, F. (2007). Performance of Blue-Yellow Screening test for antimicrobial detection in ovine Milk. *Journal of Dairy Science*, 90: 5374-5379.
116. LINDMARK, H. M.; BRANNINGA, C. y MARIE PAULSSON, G. A. (2006). Relationship between somatic cell count, individual leukocyte populations and milk components in bovine udder quarter milk. *International Dairy Journal*, 16: 717-727.
117. LITTLEFIELD, N.A.; SHELDON, W.G.; ALLEN, R. y GAYLOR, D.W. (1990). Chronic toxicity/carcinogenicity studies of sulphamethazine in Fischer 344/N rats: Two-generation exposure. *Food and Chemical Toxicology*, 28 (3): 157-167.
118. LLANOS CORTESANA, G. A. (2002). Determinación de residuos de antibióticos en la leche fresca que consume la población de Cajamarca. *Revista Amazónica de Investigación Alimentaria*, 2 (2): 35 - 43.
119. LOZANO, M. C.; ARIAS, D. C. (2008). Residuos de fármacos en alimentos de origen animal: panorama actual en Colombia. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 21: 121-135.
120. LÜCHTER F. J. (2004). Introducción al estudio de las enfermedades infecciosas: enfermedades infecciosas de los rumiantes. 1° ed. Edición Autor. Buenos Aires. 269 p.
121. LYN, R. Y. (1992). A perspective of penicillin allergy. *Archives International of Medicine*, 152: 930-937.
122. MC MANUS, M. C. (1997). Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 54: 1420-1433.
123. 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.
124. MAGRIN, G. O.; TRAVASSO, M. I.; LÓPEZ, G. M.; RODRÍGUEZ, G. R. y LLOVERAS, A. R. (2006). Capítulo 1 del Informe del clima de la región panpeana en:

Bibliografía

http://www.ambiente.gov.ar/archivos/web/ucc/file/comunicaciones_nacionales/vulnerabilidad_produccion_agricola_region_pampeana.pdf. Consulta: 12/11/2012

125.M.A.G. y P. (2011) Indicadores mensuales de la producción Argentina de leche. Subsecretaría de Lechería. En http://www.minagri.gob.ar/site/_subsecretaria_de_lecheria/lecheria/07_Estad%C3%ADsticas/_01_Nacional/mensual/Indica_2011.pdf. Consulta: 20/10/2012

126.MAKOVEK, J. A. y RUEGG, P. L. (2003). Results of milk samples submitted for microbiological examination in wisconsin from 1994 to 2001. *Journal of Dairy Science*, 86: 3466–3472.

127.MARÍN, M. y GUDIOL, F. (2003). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 21(1): 42-56.

128.MARQUES-FONTES, E.; MARTINS, S. y CARRAPICO, B. (1996). Determinations of penicillin G in commercialised milk by reverse phase high performance liquid chromatography. En: ZORRAQUINO LOZANO, M.; BERRUGA FERNÁNDEZ; M. y MOLINA PONS, M. (2007). Investigación de campo, de los antibióticos (principio activo/formulación) utilizados en vacuno de leche en España y patología tratada. *Universitat Politècnica de València*.

129.MARTÍNEZ-CARBALLO, E.; GONZÁLEZ-BARREIRO, C.; SCHARF, S. y GANS, O. (2007). Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria. *Environmental Pollution*, 148: 570-579.

130.MATHEW, A. G.; CISELL, 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.

131.MATTAR, S.; CALDERÓN, A.; SOTELO, D.; SIERRA, M. Y TORDECILLA, G. (2009). Detección de Antibióticos en Leches: Un Problema de Salud Pública. *Revista de Salud Pública*, 11 (4): 579-590.

132.MÄYRÄ-MÄKINEN, A. (1993). The Valio T 101. En: Inhibitory substances in milk –current analytical practice. *Bulletin of the IDF N° 283*. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica. 29-31.

133.MCS 2004. Milk control station on The Netherlands annual report (2004). En: ZORRAQUINO LOZANO, M.; BERRUGA FERNÁNDEZ; M. y MOLINA PONS, M.

Bibliografía

2007. Investigación de campo, de los antibióticos (principio active/formulación) utilizados en vacuno de leche en España y patología tratada. Universitat Politècnica de València.
134. MELENDEZ, P.; MCHALE, J.; BARTOLOME, J.; ARCHBALD, L.E. y DONOVAN, G. (2004). Uterine involution and fertility of Holstein cows subsequent to early postpartum IGF2a treatment for acute puerperal metritis. *Journal of Dairy Science*, 87: 3238-3246.
135. MELLA, M. S.; SEPÚLVEDA, A.; GONZÁLEZ, G.; HELIA BELLO, T.; DOMÍNGUEZ, M.; ZEMELMAN, R. y RAMÍREZ, C. (2004). Aminoglucósidos-aminociclitoles: Características estructurales y nuevos aspectos sobre su resistencia. *Revista Chilena de Infectología*, 21 (4): 330-338.
136. MELLGREN, C.; STERNESJO, A.; HAMMER, P.; SUHREN, G.; BJORCK, L. y HEESCHEN, W. (1996). Comparison of biosensor, microbiological, immunochemical and physical methods for detection of sulfamethazine residues in raw milk. *Journal of Food Protection*, 59 (11): 1223-1226.
137. MILTENBURG, J.D.; LANGE, D. DE; CRAUWELS, A.P.P.; BONGERS, J.H.; TIELEN, M.J.M.; SCHUKKEN, Y.H. y ELBERS, A.R.W. (1996). Incidence of clinical mastitis in a random sample of dairy herds in the southern Netherlands. *Veterinary Record*, 139(9): 204-207.
138. MOLINA, M. P.; ALTHAUS, R. L.; MOLINA, A.; TORRES, A. y FERNANDEZ, N. (2003). Antimicrobial agent detection in ewe milk by microbial inhibitor test (Brilliant Black Reduction Test -BRT®). *International Dairy Journal*, 13: 821-826.
139. MONTANARO, A. (1998). Sulphonamide allergy. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 18: 843.
140. MONTERO, A.; ALTHAUS, R. L.; MOLINA, A.; BERRUGA, I y MOLINA, M. P. (2005). Detection of antimicrobial agents by a specific microbiological method (Eclipse® 100ov) for ewe milk. *Small Ruminant Research*, 57: 229-237.
141. MORÉTAÍN, J.P., (1996). Eliminación de medicamentos veterinarios en el leche. XIII Reunión de técnicos especialistas en control de mastitis 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

Bibliografía

- de detección de inhibidores en la leche de oveja. *Producción Ovina y Caprina*. XXIII: 159-162.
142. MULAZIMOGLU, L.; TULKENS, P.; VAN BAMBEKE, F. (2005). Macrolides. In: YU, V. L.; EDWARDS, G.; MCKINNON, P. S.; PELOQUIN C. y MORSE G. D. Eds. *Antimicrobial Therapy and Vaccines. Volume II: Antimicrobial Agents*. 2da Edición. ESun Technologies. Pittsburg. USA. 243-280 p.
143. MÜLLER, U. y SAUERWEIN, H. (2010). A comparison of somatic cell count between organic and conventional dairy cow herds in West Germany stressing dry period related changes. *Livestock Science*, 127: 30–37.
144. MURPHY, J. J. (1999). The effects of increasing the proportion of molasses in the diet of milking dairy cows on milk production and composition. *Animal Feed Science and Technology*, 78: 189-198.
145. MURRAY, R. D.; Downham, D. Y.; Clarkson, M. J.; Faull, W. B.; Hughes, J. W.; Manson, F. J.; Merritt, J. B.; Russell, W. B.; Sutherst, J. E. y Ward, W. R. (1996). Epidemiology of lameness in dairy cattle: description and analysis of foot lesions. *Veterinary Record*, 138: 586-591.
146. NAGEL, O., ZAPATA, M. L., BASILICO, J. C., MOLINA, P. y ALTHAUS, R. (2009). Effect of Chloramphenicol on a Bioassay Response for the Detection of Tetracycline Residues in Milk. *Journal Food and Drug Analysis*, 7: 36-42.
147. NAGEL, O.G.; 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.
148. NAGEL, O.G; MOLINA, M.P.; ALTHAUS, R.L. (2011b). Microbial system for identification of antibiotic residues in milk. *J. Food and Drug Analysis*. 19(3): 369-375.
149. NAGEL, O.G; MOLINA, M.P.; ALTHAUS, R.L. (2012a). Use chemometric techniques to optimization of a specific bioassay for betalactams in milk. *Letters in Applied Microbiology (ISSN 0266-8254)*. 54(1) 32-38.
150. NAGEL, O. G.; MOLINA, M. P.; ALTHAUS, R. L. (2012b). Use of chemometric techniques to design a microbiological method for sulfamide detection in milk. *Czech Journal of Food Sciences (1212-1800)*. En prensa

Bibliografía

151. NAWAZ, M.; WANG, J.; ZHOU, A.; CHAOFENG MA; XIAOKANG WU; MOORE, J; MILLAR, B. C. y JIRU XU. (2011). Characterization and Transfer of Antibiotic Resistance in Lactic Acid Bacteria from Fermented Food Products. *Current Microbiology*, 62:1081–1089.
152. NEVES, C. A.; SANTOS, G. T.; MATSUSHITA, M.; ALVES, E. M.; OLIVEIRA, R. L.; BRANCO, A. F.; SILVA, D. C.; FURLAN, A. C. y PETIT, H. V. (2001). Intake, whole tract digestibility, milk production, and milk composition of Holstein cows fed extruded soybeans treated with or without lignosulfonate. *Animal Feed Science and Technology*, 134: 32–44.
153. NOA-LIMA, E.; NOA, M.; GONZÁLEZ, D.; LANDEROS, P. y REYES, W. (2009). Evaluación de la presencia de residuos de antibióticos y quimioterapéuticos en leche en Jalisco, México. *Revista de Salud Animal*, 31 (1): 29-33.
154. OJHA, S. y KOSTRZYNSKA, M. (2008). Examination of animal and zoonotic pathogens using microarrays. *Veterinary Research.*, 39 (04) 1-22.
155. OLIVEIRA, M. C. (2011). Doenças infecciosas em sistemas intensivos de produção de leite. *Napgama*, 2: 16–20.
156. OLIVEIRA, R. C.; PASCHOAL, J. A. R. y REYES, F. G. R. (2011). Streptomycin and dihydrostreptomycin residues in bovine milk from the Brazilian retail market. *Food Additives and Contaminants: Part B*, 3 (3): 156–162.
157. OLIVER, S. P.; PIGHETTI, G. M. y ALMEIDA, R. A. (2011). Mastitis pathogens: Environmental pathogens. *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)*, 415–421.
158. OLESEN, J.E.; Nielsen, S.A.; Hansen, J.W. y Nansen, P. (1985). Summer mastitis: Incidence, time of appearance etc. in relation to climate in the observation period 1953-1981. Copenhagen (Dinamarca). *SJF*, Feb 1985: 148-167.
159. ORTIZ Z, C.; VERA, R.; y CAYRO, J. (2008). Frecuencia de β -lactámicos y tetraciclinas en leche fresca en la Cuenca de Arequipa. *Revista de investigación veterinaria*. Lima. Perú 19 (2): 140-143.
160. OVERTON, M.W.; SISCHO, W.M. y REYNOLDS, J.P. (2003). Evaluation of estradiol cypionate administered prophylactically to postparturient dairy cows at high risk for metritis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 223: 846-851.

Bibliografía

161. PACKHAM, W.; BROOME, M.; LIMSOWTIN, G. K. y ROGINSKI, H. (2001). Limitations of standard antibiotic screening assays when applied to milk for cheese making. *Australian Journal Dairy Tech*, 56: 15-18.
162. PADGETT, D. y GLASER, R. (2003). How stress influences the immune response. *Trends in Immunology*, 24 (8): 444-448.
163. PALMER, C. (2007). Metritis postparto en vacas lecheras. *Taurus*, 9 (36): 20-37.
164. 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.
165. PASTOR, G. F. J. I. y BEDOLLA, C. J. L. (2008). Determinación de la prevalencia de mastitis bovina en el municipio de Tarímbaro, Michoacán, mediante la prueba de California. *Revista electrónica de Veterinaria IX* (10): 1695-7504
166. PAYNE, M.; BRUHN, C.; REED, B.; SCEARCE, A. y O'DONNELL, J. (1999). On-farm quality assurance programs: a survey of producer and industry leader opinions. *Journal of Dairy Science*, 82: 2224-2230.
167. PEREZ CABAL, M.; YAICI, S. y ALENDA, R. (2008). Mastitis clínica en vacas lecheras españolas: incidencia y los costos. *Revista Española de Investigación Agrícola*, 6 (4): 615-622.
168. PERRETEN, V. y 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. 144-148 p.
169. PERUSIA, O. R. (2001). Casuística clínica regional en rodeos lecheros. *Revista de Investigaciones Veterinarias de Perú*, 12(2): 123-134.
170. PETKOV, P.; ILIEV, T. y NAJDENOVA, N. (2009). A study on the transformed number of somatic cells in cows milk in relation to some factors. *Journal of Animal Science*, 46 (3): 27-33.
171. PHILIP, R. S.; COLIN, D. P. y ALASTAIR, I. M. (2011). *Cattle medicine*. 1 ed. London (Inglaterra). Manson Veterinary Press. 288p.
172. PHILLIPS, C. J. C. (1996). *Avances de la ciencia de la producción lechera*. 1 ed. Zaragoza (España). ACRIBIA, S.A. 417p.

Bibliografía

- 173.PIKKEMAAT, M.; RAPALLINI, M.; OSTRA-VAN DIJK, S. y ELFERINKA, J. (2009). Comparison of three microbial screening methods for antibiotics using routine monitoring samples. *Analytica Chimica Acta*, 637: 298-304.
- 174.PINTIC, N.; DAKIĆ, A.; POLJAK, F.; STRUČIĆ, D.; TOMŠE-ĐURANEC, V. y PINTIĆ, T. (2006). Učestalost pojave antibiotika i drugih antibakterijskih tvari u mlijeku isporučenom za tržište. *Stočarstvo*, 60 (2): 83-95.
175. POZO LORA, R.; HERRERA MARTEACHE, A.; POLO VILLAR, L. M.; LOPEZ GIMENEZ, R. R.; JODRAL VILLAREJO, M. y IGLESIAS PEREZ, J. (1977). Investigación sobre la presencia de antibioticos en la leche en la region sur de España. *Archivos de Zootecnia*. 26 (102): 125-145.
- 176.POZO DEL, E.; RIVERO, L. y GARCÍA, M. (1986). Determinación de residuos de estreptomicina en muestras de leche, que provienen de algunas vaquerías de la periferia de la Habana. *Revista Cubana de Ciencias Veterinarias*, 1986: 145-148.
- 177.POZO DEL, E.; RIVERO, L. y GARCÍA, M. (1987). Presencia de penicilina, estreptomicina y tetraciclina en leche fresca procedente de dos plantas pasteurizadoras de la provincia de la Habana. *Revista Cubana de Ciencias Veterinarias*, 1987: 27-30.
- 178.PROCALE (1992). Proyecto Calidad Higiénico-Sanitaria de la Leche. INTA Rafaela. 18 p.
- 179.PUGH, D.G.; LOWDER, M.Q. y WENZEL, J.G.W. (1994). Retrospective analysis of the management of 78 cases of postpartum metritis in the cow. *Theriogenology*, 42: 455-463.
180. QURESHI, S.; RICHARDS, B.; HAY, A.; TSAI, C.; MCBRIDE, M.; BAVEYE, P. y STEENHUIS, T. (2003). Effect of microbial activity on trace element release from sewage sludge. *Environment Science Technology*, 37: 3361-3366.
- 181.RADINOVIC, M.; Trivunović, S.; Kučević, D.; Đedović, R. y Bogdanović, V. (2011). Evaluation of breeding values of bulls for somatic cell count in milk. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 27 (3-2): 1059-1066.
- 182.RAMOS, J.M. y ACUÑA, R. (2004). Laminitis en bovinos lecheros, descripción de un brote” XXXII Jornadas Uruguayas de Buiatría, 22: 186-187.
- 183.RAMOS, J.M. y GONZÁLEZ, A. (2004). Hoof care and cow comfort: productive remarks. 1: Levelling and mechanics of cow foot rest. *Summa*, 21 (4): 21-28.

Bibliografía

184. READ, D. H.; HIRD, D. y WALKER, R. (1998). Experimental transmission of papillomatous digital dermatitis in cattle. Proceedings of the 10th International Symposium on lameness in ruminant, Lucerne, 271-272 p.
185. RENSIS, F. y SCARAMUZZI, R. (2000). The heat stress and seasonal effects on reproduction in dairy cow. *Annali della Facolta' di Medicina Veterinaria - Universita' di Parma*, 20: 83-92.
186. REVELLI, G. R.; SBODIO, O. A. y TERCERO, E. J. (2011). Estudio y evolución de la calidad de leche cruda en tambos de la zona noroeste de Santa Fe y sur de Santiago del Estero, Argentina (1993–2009). *Revista de Investigación Animal*, 37 (2): 128-139.
187. RIVERA, H. G.; BENITO, A. Z.; RAMOS, O. C.4 y MANCHEGO, A. S. (2004). Prevalencia de enfermedades de impacto reproductivo en bovinos de la estación experimental de trópico del centro de investigaciones ivita. *Revista de Investigaciones Veterinarias de Perú*, 15 (2): 120-126.
188. RIVERO, R.; FARÍA, R. y SANTORO, S. (1994). Aislamientos de gran negativos en leche cruda con antibióticas. *Revista Científica FCV-LUZ*, IV (1): 11-16.
189. ROBERT, A. SEEGER S, H. y BAREILLE, N. 2005. Incidence of intramammary infections during the dry period without or with antibiotic treatment in dairy cows – a quantitative analysis of published data. *Veterinary Research* 37: 25–48.
190. ROCA, M.; CASTILLO, M.; MARTÍ, P.; ALTHAUS, R. L. y MOLINA M. P. (2010). Effect of heating on the stability of quinolones in milk. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 58(9): 5427-5431.
191. ROCA, M.; VILLEGAS, M.; KORBITARTE, M. L.; ALTHAUS, R.L. y MOLINA, M. P. (2011). Effect of heat treatments on stability on β -lactams in milk. *Journal of Dairy Science*, 94 (3): 1155-1164.
192. ROCA, M.; VILLEGAS, M.; KORBITARTE, M. L.; ALTHAUS, R.L. y MOLINA, M. P. (2013). Thermodynamic Analysis of the Thermal Stability of Sulphonamides in Milk. *Journal of Food Chemistry*, 136 (2): 376-383.
193. ROSCA, P.; DRUGOCIU, D.; RUNCEANU, L. y CIORNEI, S. (2009). Study on the correlation between the number of somatic cells and some milk constituents resulted from cows with clinical mastitis. *Cercetari agronomice in Moldova*, 1: 71-76.

Bibliografía

- 194.RODRIGUES, A. C. O.; CARAVIELLO, D. Z. y RUEGG, P. L. (2004). Financial losses and management practices associated with BTSCC. *Journal of Dairy Science*, 87: 375-382.
- 195.RUBIO, M. y BOGGIO, J.C. (2009). *Farmacología Veterinaria*, 2ed. Córdoba, Argentina. EDUCC. ISBN: 987-1203-03-9, 642p.
- 196.RUEGG, P.L. y TABONE, T.J. (2000). The relationship between antibiotic residue violations and somatic cell counts in Wisconsin dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 83: 2805-2809.
- 197.RUEGG, P. L. (2003). Practical Food Safety Interventions for Dairy Production. *Journal of Dairy Science*, 86(E): E1–E9.
- 198.RUIZ, V. y MORENO, G. (2005). *Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. Ed. Médica Panamericana. Madrid. 209-210 p.
- 199.RUTTER, B.; IERACE, A. y BOTTARO, A. (2001). Digital dermatitis in Friesian cattle in Argentina, and its treatment with cefquinone. *Revista de Medicina Veterinaria*, 82: 242-243.
- 200.RUSKA, D.; JONKUS, D. y JONKUS, E. (2012). Changes in the traits of the milk productivity of dairy cows depending on different count of somatic cells in milk. Conference: *Zinātne Latvijas lauksaimniecības nākotnei: pārtika, lopbarība, šķiedra un enerģija*, 1, Jelgava (Latvia), 23-24.
- 201.RYSANEK, D.; BABAK, V. y ZOUHAROVA, M. (2007). Bulk tank milk somatic cell count and sources of raw milk contamination with mastitis pathogens. *Veterinary Medicinal – UZPI*, 52(6): 223-230.
- 202.SALCEDO, Y.; RIBEIRO, J.; TORO, G.; RIVERA, C.; MACHADO, M. y MANRIQUE, A. (2012). Acidosis ruminal en bovinos lecheros: implicaciones sobre la producción y la salud animal – Ruminal acidosis in dairy cattle: implications for animal health and production. *Revista electrónica Veterinaria*, 13 (4): 1-10.
- 203.SÁNCHEZ, A.; HERNANDEZ, M.; LUNA, J.; MOYANO, G.; VILLABUEVA, M. y MUÑOZ, E. (2001). Riesgos de residuos en leche debidos a tratamientos indebidos. En: ZORRAQUINO LOZANO, M.; BERRUGA FERNÁNDEZ; M. y MOLINA PONS, M. (2007). *Investigación de campo, de los antibióticos (principio*

Bibliografía

active/formulación) utilizados en vacuno de leche en España y patología tratada. Universitat Politècnica de València.

204.SARGEANT, J. M.; SCHUKKEN, Y. H. y LESLIE, K. E. (1998). Ontario bulk milk somatic cell count reduction program: progress and outlook. *Journal of Dairy Science*, 81:1545-1554.

205.SARMAH, A. K.; MEYER, M. T. 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.

206.SAGPyA (Secretaría de Agricultura Ganadería Pesca y Alimentos). (2011). Indicadores Lácteos 2010. Estadísticas de Producción Primaria. Lechería. Disponible en http://www.alimentosargentinos.gov.ar/lacteos/docs/02_Nacional/indica/Indica10_08.html.

207.SAVILLE, W.J. A.; WITTUM, T. E. y SMITH, K. L. (2000). Association between measures of milk quality and risk of violative antimicrobial residues in grade-A milk. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 3. 217: 541-545.

208.SAWANT, A. A.; SORDILLO, L. M. y JAYARAO, B. M. (2005). A Survey on Antibiotic Usage in Dairy Herds in Pennsylvania. *Journal of Dairy Science*, 88: 2991–2999.

209.SCHNACK, J.; FRANCESCO, F.; COLADO, U.; NOVOA, M. y SCHNACK, E. (2000). Humedales antrópicos: su contribución para la conservación de la biodiversidad en los dominios subtropical y pampásico de la Argentina. *Ecología Austral*, 10: 63-80.

210.SCHUKKEN, Y. H.; WILSON, D. J.; WELCOME, F.; GARRISON-TIKOFSKY, L. y GONZALEZ, R. N. (2003). Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. *Veterinary Research*, 34: 579–596.

211.SCHWARZ, S.; KEHRENBERG, C. y WALSH, T.R. (2001). Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production, *International Journal of Antimicrobial Agents* 17: 431-437.

212.SCHWARZ, S. y CHASLUS-DANCLA, E. (2001). Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Veterinary Research*, 32: 201–225.

Bibliografía

213. SCROLLAVEZZA, P.; ANSALONI, F.; POLIDORI, P.; ABLONDI, M. y POGLIACANI, B. (2002). Ozonized autohemotherapy - a new method to treat dairy cow acute interdigital phlegmon. Comparison with ceftiofur and oxytetracycline. *Italian Journal of Animal Science*, 1(3): 211-216.
214. SEEGERS, H.; FOURICHON, C. y BEAUDEAU, F. (2003). Production effects related in mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Veterinary Research*, 34(5): 475-491.
215. SEGALA, C.Z.S y SILVA, I.T. da. (2007). Apuração dos custos na produção de leite em uma propriedade rural do município de Irani-SC. *Custos e agronegócio on line*. 3: 61-86.
216. SENASA (Servicio de Sanidad y Calidad Agroalimentaria). (1999). Decreto 815/1999. 24 de julio 1999. pp. 14.
217. SENASA (Servicio de Sanidad y Calidad Agroalimentaria). (2000). Normativa UE Tambos UE4, UE5, UE6. Parte de Supervisión. 10-21 p.
218. 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>.
219. 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>.
220. SEVERIN, G. (2008). Recuento de células somáticas. *Producir XXI*, 16 (196): 8-10.
221. SEYMOUR, E.H.; JONES, G.M. y MCGILLIARD, M.L. (1988). Persistence of residues in milk following antibiotic treatment of dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 71: 2292-2296.
222. SHARMA, N.; SINGH, N. K. y BHADWAL, M. S. (2011). Relationship of Somatic Cell Count and Mastitis: An Overview. *Asian-Aust. Journal of Animal Science*, 24 (3): 429 – 438.

Bibliografía

223. SHITANDI, A. y STERNEJO, A. (2004). Factors contributing to the occurrence of antimicrobial drug residues in Kenyan milk. *Journal of Food Protection*, 67: 399-402.
224. SILANIKOVE, N.; SHAPIRO, F. y SHINDER, D. (2009). Acute heat stress brings down milk secretion in dairy cows by up-regulating the activity of the milk-borne negative feedback regulatory system. *BMC Physiology*, 9: 13-22.
225. SINAPIS, E. (2007). Technical note: The effect of machine or hand milking on milk production, composition and SCC in mountainous Greek breed (Boutsiko) ewes. *Small Ruminant Research*, 69: 242-246.
226. SISCHO, W.M.; KIERNAN, N.E.; BURNS, C.M. y BYLER, L.I. (1997). Implementing a quality assurance program using a risk assessment tool on dairy operations. *Journal of Dairy Science*, 80(4): 777-787.
227. SMITH, K.L. y HOGAN, J.S. (1993). Environmental mastitis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract. The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 9 (3): 489-498.
228. SPRECHER, D. J.; HOSTETLER, D.E. y KANEENE, J.B. (1997). A lameness scoring system that uses posture and gait to predict dairy cattle reproductive performance. *Theriogenology*, 47: 1179-1187.
229. STAERK K.D.C.; FREI STAEHELI C.; FREI P.P.; PFEIFFER D.U.; DANUSER J.; AUDIGE L.; NICOLET J.; STRASSER M.; GOTTSTEIN B. y KIHM U. (1997). Haeufigkeit und Kosten von Gesundheitsproblemen bei Schweizer Milchkuhen und ihren Kaelbern (1993-1994). *Schweizer Archiv fuer Tierheilkunde*, V (8): 343-353.
230. STEIN, G. E. y HAVLICHEK, D. H. (1998). Newer oral antimicrobials for resistant respiratory tract pathogens. Which show the most promise? *Postgraduate Medicine*, 103 (6): 67-70 y 74-76.
231. SUHREN, G.; HAMMER, P. y HEESCHEN W. (1994). Hemmstoffe, Antibiotika und Sulfonamide. *Kiel. Milchwirtsch. Forschungsber*, 46: 237-248.
232. SUHREN, G. y WALTE, H.G. (2003). Experiences with the application of method combinations for the detection of residues of antimicrobial drugs in milk from collecting tankers. *Milchwissenschaft*, 58: 536-540.
233. SUPEK, Z. (1995). Factors influencing mastitis. 2nd Paper: Environmental effects. *Allattenyesztes es Takarmanyozas*, 44(2): 139-150.

Bibliografía

234. SYVRUD, R. S. (1988). Bovine respiratory syncytial virus in the cow/calf herd. *Veterinary Learning Systems*, 1988: 12-14.
235. TADICH, N. (2005). Bienestar animal en bovinos lecheros. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 24 (3): 293-300.
236. TAVERNA, M., CHAVEZ, M., PÁEZ, R., CUATRÍN, A. y NEGRI, L. (2005). Caracterización de la aptitud tecnológica de la leche destinada a la elaboración de leche en polvo entera en la cuenca lechera central. *Revista Argentina de Lactología*, 23: 33-49.
237. TASDEMIR, A. R.; GÖRGÜLÜ, M.; SERBESTER, U. y YURTSEVEN, S. (2011). Influencia de la grasa dietética, L-carnitina y niacina en la producción y composición de la leche de vacas lecheras en lactación media. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 45 (2): 123-130.
238. TEMAMOĞULLARI, F. y KAYA, S. (2010). Ankara Piyasasında Satılan Sütlerde Bazı Antibiyotik Kalıntılarının İnce Tabaka Kromatografisi ve Biyootografik Yöntemle Saptanması. *Journal of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Kafkas, Kars*, 16 (2): 187-191.
239. TERAN, J. C. (2007). Caracterización de la Cadena Láctea en la Argentina. *IdiaXXI*, 9: 10-17.
240. THOMPSON-CRISPI, K. A.; HINE, B.; QUINTON, M.; MIGLIOR, F. y MALLARD, B. A. (2012). Short communication: association of disease incidence and adaptive immune response in Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 95: 3888–3893.
241. TODHUNTER, D.A.; SMITH, K.L. y HOGAN, J.S. (1995). Environmental streptococcal intramammary infections of the bovine mammary gland. *Journal of Dairy Science* 78(11): 2366-2374.
242. TOMLINSON, D. J. (2003). Factores que afectan la locomoción de la vaca lechera. *Bovis*. 112: 93-111.
243. TORREMORELL, M. (2010). Climate Change and Animal Diseases. Adapting Animal Production to Changes for a Growing Human Population. *International Conference. Lleida, May 19-21*, 6: 73-81.

Bibliografía

244. TSAKOUMAGKOS, P.; SOVERNA S. y CRAVIOTTI, C. (2000). Campesinos y pequeños productores en las regiones agroecológicas de Argentina. Ministerio de Economía. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación. Dirección de Desarrollo Agropecuario. PROINDER. Serie documentos de formulación. Bs. As. (Argentina). 62 p.
245. TSENKOVA, R.; Atanassova, S.; Ozaki, Y.; Toyoda, K. y Itoh, K. (2001). Near-infrared spectroscopy for biomonitoring: influence of somatic cell count on cow's milk composition analysis. *International Dairy Journal*, 11: 779–783.
246. USDA (US Department of Agriculture). (2007). Dairy 2007, Part I: Reference of Dairy Cattle Health and Management Practices in the United States, 2007. N°480.1007p.
247. VALTORTA, S. E.; GALLARDO, M. R.; CASTRO, H. C. y CASTELLI, M. E. (1996). Efectos artificiales de sombra y la suplementación de vacas lecheras en pastoreo en Argentina. *Transacciones de la ASAE*, 39 (1): 233-236.
248. VALTORTA, S. E.; LEVA, P. E.; GALLARDO, M. R. y SCARPATI, O. E. (2002). Milk production responses during heat waves events in Argentina. *Proceedings of the 16th international congress on biometeorology*, Kansas City, 27 October–1 November 2002: 98–101.
249. VAN EENENNAAM, A. L.; CULLOR, J. S.; PERANI, L. y CARDNER, T. A.; SMITH, W. L.; DELLINGER, J.; GUTERBOCK, W. M. y JENSEN, L. (1993). Evaluation of milk antibiotic residue screening test in cattle with occurring clinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, 76: 3041-3053.
250. VAN SCHAIK, G.; LOTEM, M. y SCHUKKEN, Y. H. (2002). Trends in Somatic Cell Counts, Bacterial Counts, and Antibiotic Residue Violations in New York State During 1999–2000. *Journal of Dairy Science*, 85:782–789.
251. VASIL, M. (2007). Comparison of etiology of environmental mastitis in two herds of dairy cows. *Slovak Journal of Animal Science*, 40(3): 132-140.
252. VELTHUIS, A. y ASSELDONK, M. (2011) Process audits versus product quality monitoring of bulk milk. *Journal of Dairy Science*, 94 (1): 235-249.

Bibliografía

253. VIGLIZZO, E. F.; FRANK, F. C. y CARREÑO, L. (2005). Situación ambiental en las ecorregiones pampa y campos y malezales. *Situación Ambiental Argentina, 2005*: 263-268.
254. VILCHE, M.; MARTIN, B. y SPILLER, L. (2011). Incidencia de los eventos lluviosos en un pastizal pampeano, santa fe, argentina. *Agro-Ciencia, Chilean Journal of Agricultural & Animal Science, 28 (1)*: 29-40.
255. VILLARRUEL, R.; PINO, D.; SANCHEZ, A; GARCIA, D. y PINTO, R. (2006). Eficiencia y eficacia del uso de tilosina intramuscular en la terapéutica de las lesiones podales del bovino. *Revista Científica Universidad del Zulia (Venezuela), XVI (005)*: 466-471.
256. VIOLA, C. y DEVINCENT, 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.
257. WAAGE, S.; SVILAND, S. y ODEGAARD, S.A. (1998). Identification of risk factors for clinical mastitis in dairy heifers. *Journal of Dairy Science, 81(5)*: 1275-1284.
258. WALKER, R.; LORETZ, K. y NORDHAUSEN, R. (1995). "Spirochetes isolated from dairy cattle with papillomatous digital dermatitis and interdigital dermatitis." *Veterinary Microbiology, 47*: 343-355.
259. WANG, J. y 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.
260. WEBER, M.H.; CARBERRY, N. y PAPPAS, M.G. (1995). Antibiotic residue detection in processed milk products using the Fluorophos BetaScreen test kit [sensitivity to Beta-lactam drugs as Ampicillin, Amoxillin, Cloxacillin, Dicloxacillin, Oxacillin and Penicillin-G]. Conference: Residues of antimicrobial drugs and other inhibitors in milk, Kiel (Germany), 28-31.
261. WEST, W.; MULLINIX, B. y BERNARD, J. (2003). Effects of Hot, Humid Weather on milk temperature, dry matter intake, and milk yield of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science, 86*: 232-242.

Bibliografía

262. WICKS, H. C. F y LEAVER, J. D. (2006). Influence of genetic merit and environment on somatic cell counts of Holstein–Friesian cows. *The Veterinary Journal*, 172: 52–57.
263. WILKE, M. S.; ANDREW, L.; LOVERING, A. L. y STRYNADKA, N. C. (2005). β -Lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Current Opinion in Microbiology* 8: 525-533 Wolfson, J. S.; Hooper, D. C. 1989. Fluoroquinolone antimicrobial agents. *Journal of Clinical Microbiology*, 2: 378-424.
264. WRONSKI, M.; JARMUZ, W. y SKRZYPEK, R. (2007). Factors associated with the levels of somatic cells and microorganisms in bulk tank milk. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 57(4): 481-485.
265. YAMAKI M., BERRUGA, M. I.; ALTHAUS, R., MOLINA, M. P. y MOLINA, A. (2004). Occurrence of Antibiotic Residues in Milk from Manchega ewe Dairy farms. *Journal of Dairy Science*, 87: 3132-3137.
266. YASMIN, A.; HUMA, N.; SADIQ BUTT, M.; ZAHOOR, T. y YASIN, M. (2012). Seasonal variation in milk vitamin contents available for processing in Punjab, Pakistan. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 11: 99–105.
267. 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. 1859-1872 p.
268. ZAJAC, P.; TOMÁŠKA, M.; MURÁROVÁ, A.; ČAPLA, J. y ČURLEJ, J. 2012. Quality and safety of raw cow's milk in slovakia in (2011). *Potravinarstvo*. 6 (2): 64-73.
269. ZEHNER, M.; Farnsworth, R.; Appleman, R.; Larntz, K. y Springer, J. 1986. Growth of Environmental Mastitis Pathogens in Various Bedding Materials. *Journal of Dairy Science*, 69 (7): 1932–1941.
270. ZORRAQUINO, M.A. (2005). Inactivación térmica de sustancias antimicrobianas en leche. Tesis Doctoral. Universidad Pública de Navarra. España.
271. ZORRAQUINO, M.; BERRUGA FERNÁNDEZ; M. y MOLINA PONS, M. (2007). Investigación de campo, de los antibióticos (principio activo/formulación) utilizados en vacuno de leche en España y patología tratada. Universitat Politècnica de València.

Bibliografía

- 272.ZORRAQUINO, M.; ROCA, M.; CASTILLO, M.; ALTHAUS, R. y MOLINA, M. (2008a). Effect of thermal treatments on the activity of quinolones in milk. *Milchwissenschaft*, 63: 192-195.
- 273.ZORRAQUINO, M.; ROCA, M.; FERNANDEZ, N.; MOLINA, M.; ALTHAUS, R. (2008b). Heat inactivation of beta-lactam antibiotics in milk. *Journal of Food Protection*, 71: 1193-1198.
- 274.ZORRAQUINO LOZANO, M. (2008c). Investigación de campo sobre tratamientos antimicrobianos en vacuno de leche en procesos patológicos no mamáticos. Universidad Pública de Navarra.
- 275.ZORRAQUINO, M.; ALTHAUS, R.; ROCA, M. y MOLINA, M. (2009). Effect of industrial heat treatments on the antimicrobial activity of aminoglycosides in milk. *Journal of Food protection*, 72: 1338-1341.
- 276.ZORRAQUINO, M. A.; ALTHAUS, R. L.; ROCA, M. y MOLINA, M. P. (2011). Heat Treatment effects on the antimicrobial activity of macrolide and lincosamide antibiotics in milk. *Journal of Food Protection*, 74 (2): 311-315.
- 277.ZWALD, A. G.; RUEGG, P. L.; KANEENE, J. B.; WARNICK, L. D.; WELLS, S. J.; FOSSLER, C. y HALBERT, L. W. (2004). Management Practices and Reported Antimicrobial Usage on Conventional and Organic Dairy Farms. American Dairy Science Association. *Journal of Dairy Science*, 87: 191–200.