



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA



LABORATORIO DE PATOLOGIA CLINICA

Av. Circunvalación – Cda. 29 San Borja
Telf. 435-3348 – Anexo 237

**EVALUACION DE LA PRESENCIA DE RESIDUOS DE ANTIBIOTICOS
EN LECHE DE VACAS CON UNA SOLA APLICACION
INTRAMAMARIA CON EL PRODUCTO *CEFA MILK® FORTE***

INTRODUCCION

El uso de antibióticos es sin lugar a dudas una de las principales herramientas en el control y erradicación de numerosas enfermedades infecciosas de origen bacteriano en animales de producción y compañía. Sin embargo su empleo requiere de evaluaciones y pruebas que demuestren la inexistencia de concentraciones de estas drogas en leche, carne y otros productos de origen animal, con el fin que la población humana reciba un alimento de buena calidad exenta de residuos de estas drogas.

El término residuos, se refiere a pequeñas concentraciones de estos fármacos que quedan en leche o carne después de finalizado un tratamiento, independiente de la vía de administración del producto (parenteral, intrauterina o intra mamaria).

Es importante destacar, que estos residuos causan algunos problemas en la industria lechera, ya que la elaboración de derivados lácteos como queso y yogurt necesitan el desarrollo de la flora ácido láctico. Esta flora, es inhibida por la presencia de concentraciones pequeñas de antibióticos, razón por la cual las industrias realizan rutinariamente un control interno, para separar la leche ausente de estos residuos y destinarla a la elaboración de estos productos

Los riesgos de estos fármacos en la población humana se centran fundamentalmente en los siguientes aspectos: reacciones de hipersensibilidad, efectos tóxicos específicos, aparición de cepas resistentes y susceptibles de ser transmitidas al hombre y alteraciones de la flora intestinal.

Por ello en la actualidad se debe conocer las concentraciones máximas permitidas, y como herramienta para su detección existen diversos métodos para estimar las concentraciones máximas permitidas en la leche.

Existen en el mercado una amplia variedad de métodos de cribado, comercializados por diferentes laboratorios y empresas que permiten detectar en forma rápida y precisa la presencia de residuos de agentes antimicrobianos en leche. En el boletín N° 258 de la Federación Internacional de Lechería (FIL, 1991) se presenta una recopilación de las características (principio, sensibilidad, niveles de detección, metodología, etc.) de un número de métodos comercializados para el análisis de la leche. Actualmente, son muy populares los métodos basados en *Geobacillus stearothermophilus* o *Streptococcus thermophilus*, tanto en versión de difusión en tubo como en ensayos de disco, sin embargo anteriormente, se empleaba ampliamente el *Bacillus subtilis*, en versiones de pocillos en agar y principalmente como ensayos de disco (FIL 258/1991; Botsoglou & Fletouris, 2001). Dependiendo de cada test, la presencia de una sustancia antimicrobiana en la muestra se detectará por cambios de color o por observación en el medio de zonas de inhibición del crecimiento, que luego serán medidas con ayuda de algún instrumento de medida.

Uno de estos métodos es el Test cualitativo Delvotest® SP - NT es una prueba de difusión estándar para la detección de los residuos de sustancias antibacterianas (tales como antibióticos y sulfonamidas).



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA



LABORATORIO DE PATOLOGIA CLINICA

Av. Circunvalación – Cda. 29 San Borja
Telf. 435-3348 – Anexo 237

La prueba consiste de ampolletas que contienen al medio sólido agar sembrado de un número estandarizado de las esporas de *Bacillus stearothermophilus* var. *Calidolactis*, junto con nutrientes requeridos para el crecimiento y un antifolate trimetoprim. El medio es coloreado púrpura por el indicador de pH púrpura de bromocresol. Las muestras de leche que están libres de sustancias antibacterianas, o las que contienen debajo de niveles especificados, cuando se les hace la prueba son añadidas a un nivel de 0,1 mL e incubadas a 64°C permitiendo a la germinación y el crecimiento de la bacteria. Esto conducirá a un cambio en colores del indicador de color púrpura a amarillo. Cuando la muestra de leche contiene sustancias antibacterianas encima de la sensibilidad de la prueba, el crecimiento es inhibido y como resultado el color permanece púrpura.

Existen otros métodos basados en este mismo fundamento de la de inhibición microbiológica, como el BRT, CHR-Hansen, Eclipse, etc.

Cefa Milk® Forte es una infusión antibiótica intramamaria para vacas en lactación que está indicada para el tratamiento de mastitis de bovinos, ovinos y caprinos en producción láctea causada por gérmenes sensibles a la cefalexina y/o gentamicina.

La cefalexina es una cefalosporina de primera generación, antibiótico bactericida que ha demostrado ser eficaz en el tratamiento y prevención de la mastitis.

Su efectividad es inmediata, ejerciendo su acción durante las primeras 24 horas de aplicado el producto. Es el antibiótico que posee el más alto coeficiente de penetración-biodisponibilidad en la glándula mamaria. Esto debido a 3 razones fundamentales: 1) Posee el porcentaje más bajo de ionización en la glándula mamaria (Ziv; 1980), 2) Su fracción no ionizada posee una elevada liposolubilidad por lo que atraviesa fácilmente las membranas celulares y 3) tiene una unión muy baja con las proteínas de la leche (10%) lo que permite una disponibilidad del 90%. Además dicha unión es reversible, funcionando como reservorio del antibiótico.

Es activo contra la mayoría de bacterias Gram positivas; entre ellas variedades susceptibles de *Streptococcus agalactiae* y *Staphylococcus aureus*; incluyendo variedades resistentes a la penicilina (penicilinasas positivos) que son la principal causa de mastitis. Así mismo es eficaz contra algunas Gram negativas; incluyendo *E.coli*, *Proteus sp.*, *Klebsiella sp.*, *Salmonella*, *Shigella sp.* y *Enterobacter sp.*

La gentamicina, le otorga un refuerzo poderoso contra microorganismos sensibles (básicamente Gram negativos); tal es el caso de las mastitis producidas por *E.coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Klebsiella sp.*, *Enterobacter sp.*, *Candida*, entre otras. Con la adición de gentamicina, **Cefa-Milk® Forte** posee un espectro completo contra todas las bacterias productoras de mastitis.

La adición de dexametasona, le otorga un rápido efecto antiinflamatorio, reduciendo además los síntomas que causan dolor y malestar al animal, permitiendo una mejor llegada de los antibióticos al foco de la infección, lo cual brinda un mayor efecto terapéutico, produce un control efectivo de la mastitis clínica y subclínica, posibilitando una producción de leche de mejor calidad.

Además, contiene Vitamina A, como regenerador epitelial de las capas internas de la glándula mamaria. Esta adición de Vitamina A, reduce las consecuencias del proceso infeccioso y participa manteniendo la integridad de los tejidos intramamarios.

La presente evaluación tiene como finalidad demostrar la inexistencia de residuos o trazas de antibióticos en la leche al uso del **Cefa Milk® Forte** a dosis terapéuticas.



**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA**

LABORATORIO DE PATOLOGIA CLINICA

Av. Circunvalación – Cda. 29 San Borja
Telf. 435-3348 – Anexo 237



C. Metodología de trabajo.

Lugar de Ejecución:

Establo Casablanca en el distrito de Pachacamac, departamento de Lima.

Materiales:

- Veinte (20) Vacas lecheras.
- Jeringa de Infusión antibiótica intramamaria sobre la base de Cefalexina, Gentamicina, Dexametasona y Vitamina A (Cefa-Milk® Forte).
- Aretes Boviflex para identificación.
- Botas descartables o de goma.
- Material para análisis de Leche.
- Kit Delvotest® SP – NT para detección de antibióticos en leche.

Metodología:

Se trabajó de la siguiente manera:

- Se seleccionaron dos grupos de trabajo: Grupo A (Tratamiento): 10 vacas lecheras; Grupo B (Control): 10 vacas lecheras sin tratamiento.
- En el Grupo A se aplicó un chisguete intramamario (una sola aplicación) por vaca.
- Una vez aplicado el producto se tomaron muestras de leche de ambos grupos a las 12, 24, 36, 48 y 60, 72 y 84 horas de dos cuartos por animal; el cuarto aplicado (Cuarto Anterior) y del otro cuarto no tratado (Cuarto Posterior).
- Se trabajó con el Kit Devotest SP – NT siguiendo estrictamente el procedimiento descrito por el fabricante.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA



LABORATORIO DE PATOLOGIA CLINICA

Av. Circunvalación – Cda. 29 San Borja
Telf. 435-3348 – Anexo 237

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados obtenidos con el Kit Delvotest® SP – NT de todos los muestreos de leche tanto de los Cuartos Tratados (Anterior) como de los Cuartos No tratados (Posterior) del Grupo Tratamiento, desde el ordeño pretratamiento hasta el séptimo ordeño postratamiento se presentan en el cuadro siguiente:

CUADRO 1: GRUPO TRATAMIENTO

IDENTIFICACION	CUARTOS MAMARIOS	N° DE ORDEÑOS POST-TRATAMIENTO (Horas de toma muestra)							
		PRE-TRATAM.	1° ORDEÑO	2° ORDEÑO	3° ORDEÑO	4° ORDEÑO	5° ORDEÑO	6° ORDEÑO	7° ORDEÑO
		00 h	12 h	24 h	48 h	72 h	60 h	72 h	84 h
		08/01(T)	09/01(M)	09/01(T)	10/01(M)	10/01(T)	11/01 (M)	11/01 (T)	12/01 (M)
OLGA	ANTERIOR	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
	POSTERIOR	NEG	NEG	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG
GRETA	ANTERIOR	NEG	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG
	POSTERIOR	NEG	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG
MECHE	ANTERIOR	NEG	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG
	POSTERIOR	NEG	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG
SOFIA	ANTERIOR	NEG	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG
	POSTERIOR	NEG	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG
CHARO	ANTERIOR	NEG	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG
	POSTERIOR	NEG	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG
1	ANTERIOR	NEG	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG
	POSTERIOR	NEG	NEG	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG
2	ANTERIOR	NEG	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG
	POSTERIOR	NEG	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG
3	ANTERIOR	NEG	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG
	POSTERIOR	NEG	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG
4	ANTERIOR	NEG	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG
	POSTERIOR	NEG	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG
5	ANTERIOR	NEG	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG
	POSTERIOR	NEG	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG

LEYENDA

Ant: Cuarto Anterior (tratado) POS: Positivo (M): Mañana
Post: Cuarto Posterior (No tratado) NEG: Negativo (T): Tarde

En este Cuadro 1, de resultados del Grupo Tratamiento se observa que todos los animales se mostraron negativos a residuos de antibióticos al momento del muestreo de pre-tratamiento en ambos cuartos mamarios muestreados.

En todos los animales se encontró que los Cuartos Anteriores (tratados) que se volvieron positivos inmediatamente a las 12 horas post-tratamiento, permaneciendo con esta condición, la mayoría de ellos, hasta el cuarto ordeño, otros hasta el quinto ordeño, pero ninguno hasta el sexto ordeño.



**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA**



LABORATORIO DE PATOLOGIA CLINICA

Av. Circunvalación – Cda. 29 San Borja
Telf. 435-3348 – Anexo 237

Al hacer un análisis de la frecuencia de positivos y negativos en estos cuartos tratados (Cuadro 2), se observa claramente que 8 animales (80 %) se mantuvieron positivos a residuos de antibiótico hasta el cuarto ordeño y 2 animales (20 %) aparecen como negativos. En el quinto ordeño (60 horas postratamiento) hay 6 animales (60 %) y 4 animales (40 %) con Cuartos Anteriores tratados que aparecen como positivos y negativos a residuos antibióticos, respectivamente. Luego en el sexto y séptimo ordeño (72 y 84 horas postratamiento) se encontraron los 10 cuartos anteriores (100 % de leches) que recibieron el tratamiento, como negativos a residuos de los antibióticos.

Algo diferente sucede con los Cuartos Posteriores (No tratados) de estas mismas vacas, que todas ellas empiezan en condición de negativas a residuos de antibióticos en el muestreo pretratamiento y luego inmediatamente al primer ordeño, solamente 08 de ellas (80 %) se muestran positivos y 02 se verifican como negativas (Vacas Olga y N° 1). Esto estaría demostrando que los antibióticos se difunden a estos cuartos no tratados, pero la difusión hacia algunos de ellos es un poco mas lenta.

En los siguientes muestreos se puede notar que sucede lo mismo que con los Cuartos Anteriores Tratados (Cuadro 2); es decir que 08 de ellos (80 %) de ellos permanecen como positivos a antibióticos hasta el cuarto ordeño y 2 (20 %) como negativos. Seguidamente en el quinto ordeño (60 horas postratamiento) a diferencia de los Cuartos Anteriores (tratados), se encontró que 08 (80 %) de estos Cuartos Posteriores (No tratados) aparecen negativos y 02 positivos (20 %), lo cual nos indicaría que los residuos del producto antibiótico en la leche de estos Cuartos Posteriores No tratados desaparecen mas rápidamente que en los Tratados. En el sexto y séptimo ordeño (72 y 84 horas postratamiento) aparecen con 100 % de leches de estos Cuartos Posteriores(No tratados) como negativos, al igual que los Cuartos Anteriores.

CUADRO 2. FRECUENCIA DE POSITIVOS Y NEGATIVOS POR CADA ORDEÑO EN LOS CUARTOS ANTERIOR (TRATADO) Y POSTERIOR (NO TRATADO).

CUARTOS	CONDICION	ORDEÑO PRE-TRAT	N° DE ORDEÑOS POST-TRATAMIENTO						
			1° ORDEÑO	2° ORDEÑO	3° ORDEÑO	4° ORDEÑO	5° ORDEÑO	6° ORDEÑO	7° ORDEÑO
ANTERIOR	POSITIVOS	0	10	9	9	8	No 6	0	0
	NEGATIVOS	10	0	1	1	2	4	10	10
POSTERIOR	POSITIVOS	0	8	10	10	8	2	0	0
	NEGATIVOS	10	2	0	0	2	8	10	10

Esta tendencia, de que en los Cuartos Mamarios Anteriores (Tratados) de las 10 vacas, la leche muestreada empieza (1° ordeño) con una frecuencia alta de positivos (10 cuartos positivos) a residuos antibióticos para ir disminuyendo hasta llegar a cero positivos (6° ordeño) se observa claramente en el Grafico 1. Mientras que con los Cuartos Mamarios Posteriores (No tratados) se observa que la frecuencia de presentación de cuartos positivos no es alta inmediatamente, sino hasta el 2° ordeño, y mas bien los Cuartos negativos aparecen con mayor frecuencia (8 cuartos negativos) al 5° ordeño.



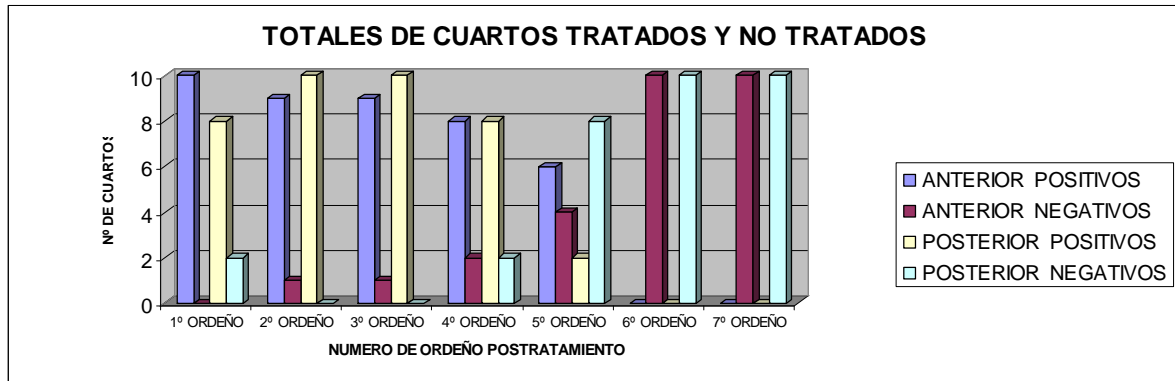
**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA**



LABORATORIO DE PATOLOGIA CLINICA

Av. Circunvalación – Cda. 29 San Borja
Telf. 435-3348 – Anexo 237

FIGURA 1:



CUADRO 3: GRUPO CONTROL

	PRE-TRATADO	1º ORDEÑO	2º ORDEÑO	3º ORDEÑO	4º ORDEÑO	5º ORDEÑO	6º ORDEÑO	7º ORDEÑO
IDENTIFICACION	0 h 8/01(T)	12 h 09/01 (M)	24 h 09/01 (T)	36 h 10/01 (M)	48 h 10/01 (T)	60 h 11/01 (M)	72 h 11/01 (T)	84 h 12/01 (M)
SOL	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
LUNA	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
BELLA	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
LAURIA	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
MERELYN	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG
1	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
2	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
3	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
4	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
5	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG

En el cuadro de resultados del Grupo Control (Cuadro 3) podemos observar que todas las vacas se encontraron negativas desde el inicio hasta el final de la prueba a excepción de Lauria, que inicialmente estuvo positiva a la presencia de antibióticos las primeras 24 horas. Esto podría deberse a que este animal estuvo con un tratamiento parenteral no registrado que hizo que aparezca el residuo en leche. Posteriormente, esta permaneció negativa a lo largo de todo el periodo de prueba.

Los resultados en el Grupo Control muestran que los animales de ambos establos en prueba permanecieron negativos a residuos de antibióticos desde el ordeño pretratamiento hasta el último ordeño, lo cual garantiza que todos los animales utilizados en el experimento, se



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA



LABORATORIO DE PATOLOGIA CLINICA

Av. Circunvalación – Cda. 29 San Borja
Telf. 435-3348 – Anexo 237

mantuvieron sin tener contacto con ninguna fuente de antimicrobianos o desinfectante que hubieran podido influenciar en los resultados obtenidos.

CONCLUSIONES

Después de una sola aplicación al Cuarto Anterior escogido para el tratamiento de las vacas de ambos establos, con el chisquete intramamario Cefa-Milk® Forte, se encontró que la residualidad dura hasta el quinto ordeño (60 horas post-tratamiento)

Se produce una difusión de los antibióticos de los cuartos tratados hacia los cuartos no tratados en forma lenta; así como la desaparición de los residuos es un poco más temprana que en caso de los cuartos tratados pero igualmente la residualidad dura hasta el quinto ordeño.

.....
QF. MSc. OLGA LI ELIAS
Responsable del Laboratorio de
Patología Clínica- FMV - UNMSM



**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA**

LABORATORIO DE PATOLOGIA CLINICA

Av. Circunvalación – Cda. 29 San Borja
Telf. 435-3348 – Anexo 237



Fotos Anexas



Vacas lecheras previas a la evaluación



Aplicación de Cefa Milk® Forte



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

LABORATORIO DE PATOLOGIA CLINICA

Av. Circunvalación – Cda. 29 San Borja
Telf. 435-3348 – Anexo 237



Kit completo Delvotest



Muestras de leche tratada con Cefa Milk Forte



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

LABORATORIO DE PATOLOGIA CLINICA

Av. Circunvalación – Cda. 29 San Borja
Telf. 435-3348 – Anexo 237



Toma de muestra de leche



Toma de resultados de kit Delvotest