

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

EAP. DE MEDICINA VETERINARIA

**Determinación de residuos de antibióticos
betalactámicos en leche de vacas postratamiento contra
mastitis mediante un ensayo inmunoenzimático**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Paul Fernando SALAS ZAMALLOA

ASESOR

Sonia Yenny CALLE ESPINOZA

Lima - Perú

2007

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	
2.1 Leche	3
2.1.1 Características y requisitos de la leche	4
2.1.2. Fuentes de contaminación de la leche	5
2.2 Mastitis	6
2.3 Tratamiento contra Mastitis	8
2.3.1 Vías de administración de antibióticos	10
2.4 Antibióticos	11
2.4.1 Betalactámicos	12
2.5 Residuos de antibióticos	19
2.5.1 Residuos de antibióticos en leche	21
2.5.2 Importancia en Salud Pública	24
2.5.3 Importancia en Industria de productos Lácteos	26
2.6 Antibióticos y Resistencia	27
2.7 Legislación sanitaria	29
2.8 Métodos de detección de residuos de antibióticos	33
III. MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1 Lugar de estudio	40
3.2 Tamaño de muestra	40
3.3 Muestras	41
3.4 Recolección de muestra	41
3.5 Materiales y equipos usados en el Laboratorio	41
3.6 Procesamiento de las muestras	42
3.6.1 Fundamento del análisis	43

3.6.2 Procedimiento del análisis	43
3.6.3 Interpretación de resultados	44
3.7 Análisis de datos	44
IV. RESULTADOS	45
V. DISCUSIÓN	48
VI. CONCLUSIONES	53
VII. RECOMENDACIONES	54
VIII. BIBLIOGRAFÍA CITADA	55
IX. APÉNDICE	63

RESUMEN

La leche constituye una vía natural de eliminación de antimicrobianos y sus metabolitos. La presencia de residuos de antibióticos no es deseable en leche debido a que pueden influir en la inducción de resistencia microbiana, desórdenes en la flora intestinal y reacciones alérgicas. El presente estudio trató de determinar si la leche de vacas que retornan a la producción después de terminado el periodo de retiro postratamiento presentan residuos de sustancias antibióticas. Se tomaron muestras de leche de 60 vacas que fueron tratadas contra mastitis con antibióticos Betalactámicos y que retornaron a la producción después de terminado el periodo de retiro de la leche (3 días). Las muestras se analizaron mediante la prueba inmunoenzimática SNAP (Betalactam), que indica la presencia de antibióticos betalactámicos en leche. De las muestras analizadas el 45% (27/60) fueron positivas a la prueba de detección de residuos de antibióticos Betalactámicos. En relación al tipo de antibiótico utilizado el 56% (14/25), 26.67% (4/15) y 45% (9/20) fueron positivas para la asociación entre Penicilina y Estreptomicina, Kanamicina y Penicilina y Amoxicilina y Ácido Clavulónico, respectivamente; de acuerdo a la vía de administración, 50% (14/28) de los animales tratados por vía intramuscular y 40.63% (13/32) por vía intramamaria fueron positivos a la prueba; de acuerdo al nivel de producción el 46.67%(7/15), 57.14% (12/21) y 33.33% (8/24) de las vacas de baja, media y alta producción, respectivamente, fueron positivas a la prueba. Se evaluó si había asociación entre cada una de las variables y la presencia de residuos de antibióticos con la prueba de Chi cuadrado, no observándose asociación entre la presencia de residuos en la leche por efecto de las variables tipo de antibiótico utilizado, vía de administración y nivel de producción. Concluyéndose que el 45% de la leche de vacas que retornan a la producción después de terminado el periodo de retiro postratamiento presentan residuos de antibióticos y además, factores como la vía de administración del antibiótico utilizado, factores intrínsecos del establo, nivel de producción lechera y tipo de antibiótico utilizado podrían influir en la persistencia de residuos de antibióticos en leche.

Palabras clave: Residuos de antibióticos, Betalactámicos, leche, vacas, mastitis

ABSTRACT

Milk constitutes a natural route of elimination of antimicrobials and its by products. The presence of the antibiotics residues is not desirable in milk because they can influence in the induction of microbial resistance, disorders of the intestinal flora and allergic reactions. The objective of the present study is to determine if the milk of cows that return to production after finished to the period of retention post treatment continues displaying residues of antibiotic substances. Samples of milk were taken from 60 cows that received treatment for mastitis with Betalactamic antibiotics and that returned to the production after finished the period of retention of milk (3 days). The samples were analyzed by means of the immunoenzymatic test SNAP (Betalactam), which indicates presence of betalactamic antibiotics residues in milk. From the analyzed samples 45% (27/60) were positive to the test of detection of betalactamic antibiotics residues. Other evaluated variables were the type of betalactamic antibiotic used. It was found that 56% (14/25), 26, 67% (4/15) and 45% (9/20) of the association between Penicillin and Streptomycin, Kanamycin and Penicillin and Amoxicillin and Clavulamic Acid, respectively, displayed antibiotic residues in milk. According to the administration route 50% (14/28) of the animals treated by intramuscular route and 40, 63% (13/32) by intramammary route were positive to the test. According to the production level the 46, 67% (7/15), 57, 14% (12/21) and 33, 33% (8/24) of the low, average and high production cows, respectively, were positive to the test. By using the Chi square test, it was evaluated if there were association between each one of the variables and the presence of antibiotic residues, not being observed association between the presence of residues in milk by effect of the type of antibiotic used, via of administration and level of production. It was concluded that 45% of the milk of cows that return to the production after finished with the period of retirement post treatment displayed antibiotic residues. Factors like the route of administration of the antibiotic used, intrinsic factors of the farm, level of milk production and type of antibiotic used could have an influence in the persistence of antibiotic residues in milk.

Key words: Antibiotic residues, Betalactamic, milk, cows, mastitis.

LISTA DE CUADROS Y TABLAS

- Cuadro N° 1: Composición promedio de la leche en vacas. Pág. 3.
- Cuadro N° 2: Requisitos físico-químicos de la leche. Pág. 4.
- Cuadro N° 3: Requisitos microbiológicos de la leche. Pág. 5.
- Cuadro N° 4: Requisitos de calidad higiénica. Pág. 5.
- Cuadro N° 5: Clasificación química de los Betalactámicos, modo de acción y espectro simplificados. Pág. 13.
- Cuadro N° 6: Principales productos a base de Betalactámicos de uso pecuario comercializados en el Perú. Pág. 15.
- Cuadro N° 7: Nivel de detección de LMR (ppb) de residuos de antibióticos Betalactámicos del SNAP Betalactam®. Pág. 43.
- Tabla N° 1: Porcentaje de animales positivos al Test de Betalactámicos. Pág. 47.
- Tabla N° 2: Porcentaje de animales positivos al Test de Betalactámicos, según antibiótico utilizado en el tratamiento. Pág. 48.
- Tabla N° 3: Porcentaje de animales positivos al Test de Betalactámicos, según la vía de administración utilizada. Pág. 48.
- Tabla N° 4: Porcentaje de animales positivos al Test de Betalactámicos, de acuerdo al nivel de producción. Pág. 49.
- Tabla N° 5: Resultados de la prueba de Chi cuadrado para cada una de las variables evaluadas. Pág. 49.

I. INTRODUCCIÓN

La leche es un alimento complejo y de elevado valor nutritivo. Estas características hacen necesaria su presencia y la de sus derivados en una dieta equilibrada. En los mamíferos, ésta constituye una vía natural de eliminación para los antibióticos y sus metabolitos durante un período variable de tiempo, que depende tanto del animal tratado (especie, raza, edad, estado fisiológico) como del medicamento utilizado (formulación, dosis, tiempo y vía de tratamiento) (Rodríguez y Rodríguez, 1995).

Unido a esto, su creciente consumo en los últimos años y su empleo principalmente en alimentación infantil, ponen de manifiesto la importancia de ejercer y mantener un control en el contenido de residuos antibióticos en este alimento, en la medida, en que su presencia plantea un problema de Salud Pública, como la presentación de toxicidad, fenómenos de antibiorresistencia y alergias; así como, la inhibición total o parcial de fermentos lácticos y proliferación incontrolada de gérmenes indeseables resistentes en subproductos lácteos; con las repercusiones económicas que provoca a ésta industria (Rodríguez, y Rodríguez, 1995).

La aparición de residuos de medicamentos y plaguicidas en la leche, se debe generalmente, a que no se respetan tiempos de espera, usan dosis excesivas en el tratamiento y se usan sustancias no permitidas o no autorizadas (Pérez *et. al*; 2005).

En el Perú, no existe una legislación vigente que norme el límite máximo permisible de residuos de antibióticos en leche. A nivel internacional cada país

establece una legislación propia sobre estos niveles. El CODEX ALIMENTARIUS, norma base de reglamentación de los alimentos; ha contemplado los niveles máximos permisibles de residuos de antibióticos en leche. Estas normas han sido usadas como referencia para el intercambio internacional de alimentos por el Acuerdo de Medidas Sanitarias y Fitosanitarias de la Organización Mundial del Comercio, organización a la cual nuestro país está adscrito.

Estos residuos de antibióticos pueden ser detectados por diversas técnicas de laboratorio, como las técnicas biológicas cualitativas, donde se utilizan microorganismos tales como: *Sarcina lutea*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, en un medio sólido y en contacto con la muestra sospechosa (Moreno, 2003); y ensayos inmunoenzimáticos de competición cuantitativos que detectan la cantidad de residuos de antibióticos presentes en la leche.

En nuestro país, se han realizado investigaciones sobre la presencia de residuos de antibióticos en leche de expendio; al respecto Gutiérrez (1962) en un estudio realizado en el departamento de Lima, determinó que de 250 muestras de leche de expendio, analizadas por métodos cualitativos, solo 2 (0.8%) de dichas muestras, presentaron residuos de antibióticos. Además, en el departamento de Cajamarca, Llanos (2002) determinó residuos de antibióticos en leche fresca de consumo utilizando dos métodos cualitativos; encontrando en promedio que el 20.83% (45/216) de las muestras, presentaron residuos de antibióticos.

El objetivo del presente estudio fue evidenciar la presencia de residuos de antibióticos detectables a una prueba inmunoenzimática, en muestras de leche de vacas que han finalizado su periodo de tratamiento contra mastitis y reingresan a la producción.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Leche

La leche es la secreción de las glándulas mamarias de los mamíferos, es un líquido de composición compleja, de color blanquecino y opaco, con un pH cercano al neutro y de sabor dulce, su propósito natural es la alimentación de la cría durante los primeros meses de vida. Desde el punto de vista legal “leche, sin otra denominación es el producto fresco del ordeño completo de una o varias vacas sanas, bien alimentadas y en reposo, exento de calostro y que cumpla con las características físicas, microbiológicas e higiénicas establecidas” (Magariños, 2000).

Cuadro Nº 1: Composición promedio de la leche en vacas

	Composición promedio de la leche en vacas (en %)					
Vaca	Grasa	Proteína	Lactosa	Cenizas	S.N.G.	ST.
	3.70	3.50	4.90	0.70	9.10	12.80

(Magariños, 2000)

2.1.1 Características y requisitos de la leche

La leche de alta calidad debe poseer las siguientes características: 1. Estar libre de todo organismo patógeno. 2. Estar libre de sedimentos y materias

totales. 3. Tener un ligero sabor dulce, un gusto y aroma suave, estar libre de olores extraños. 4. Cumplir con los requisitos estatales (Judkins *et al.*, 1984).

En la Norma Técnica peruana sobre leche fresca se indica las características generales que debe presentar la leche cruda, en ésta se indica que deberá estar exenta de sustancias conservadoras y de cualquier otra sustancia extraña a su naturaleza. La leche cruda no podrá haber sido sometida a tratamiento alguno que disminuya o modifique sus componentes originales.

Requisitos organolépticos: La leche cruda deberá estar libre de color, olor, sabor y consistencia, extraños a su naturaleza.

Requisitos físico-químicos: La leche cruda debe cumplir con los siguientes requisitos:

Cuadro Nº 2: Requisitos físico-químicos de la leche.

Ensayo	Requisito	Método de Ensayo
Materia grasa (g/100g)	Mínimo 3,2	NTP 202.028:1998 FIL-IDF ID:1996
Sólidos no grasos (g/100g)	Mínimo 8,2	*
Sólidos Totales (g/100g)	Mínimo 11,4	NTP 202.118:1998 NTP 202.116:2000
Acidez, expresada en g. de ácido láctico (g/100g)	0,14 – 0,18	NTP 202.007:1998
Densidad a 15° C (g/ml)	1,0296 – 1,0340	NTP 202.008:1998
Índice de refracción del suero, 20°C	Mínimo 1,34179 (Lectura refractométrica 37,5)	NTP 202.016: 1998
Ceniza total (<i>g</i> l OOg)	Máximo 0,7	NTP 202.172: 1998
Alcalinidad de la ceniza total (mL de Solución de NaOH 1N)	Máximo 1,7	NTP 202.172: 1998
Índice crioscópico	Máximo -0,540°C	NTP 202.184: 1998
Sustancias extrañas a su naturaleza	Ausencia	**
Prueba de alcohol (74 % v/v)	No coagulable	NTP 202.030:1998
Prueba de la reductasa con azul de metileno	Mínimo 4 horas	NTP 202.014:1998

(*) Por diferencia entre los sólidos totales y la materia grasa.

(**) Métodos mencionados en los apartados 2.1.12 al 2.1.20

Requisitos microbiológicos: La leche cruda debe cumplir con los siguientes requisitos:

Cuadro Nº 3 - Requisitos microbiológicos de la leche

Ensayo	Requisitos	Método de ensayo
Numeración de microorganismos aerobios y facultativos viables UFC/ml	Máximo 1 000 000	FIL IDF 100B:1991
Numeración de coniformes UFC/ml	Máximo 1 000	FIL IDF 73B: 1998

Requisitos de calidad higiénica: La leche cruda debe cumplir con los siguientes requisitos:

Cuadro Nº 4 - Requisitos de calidad higiénica

Ensayo	Requisitos	Método de ensayo
Conteo de células somáticas / ml	Máximo 500 000	NTP 202.173:1998

2.1.2 Fuentes de contaminación de la leche

En general puede decirse que los riesgos que esta sometida la leche entre el ordeño y su llegada al consumidor incluyen:

- Contaminación y multiplicación de microorganismos.
- Contaminación: específica por gérmenes patógenos.
- Alteración fisicoquímica de sus componentes.
- Contaminación con gérmenes causantes de malos sabores.
- Contaminación con sustancias químicas (pesticidas, antibióticos, etc.)

Las principales fuentes de contaminación se dan en el establo:

- Animal (glándula mamaria, piel, heces)
- Establo (moscas, aire, agua, forraje, paja, suelos, etc.)

- Utensilios (equipos de ordeño, baldes, tarros, filtros, enfriadora, etc.) (Magariños, 2000).

2.2 Mastitis

La mastitis es la inflamación de la glándula mamaria, y en vacas es causada por microorganismos que invaden la ubre, produciéndose un proceso inflamatorio leve o severo, la inflamación de la ubre se caracteriza por cambios en el tejido glandular y en la leche (Magariños, 2000).

En la mastitis pueden intervenir numerosos microorganismos como bacterias, levaduras, mohos, virus y otros agentes, encontrándose con mayor frecuencia: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis*, *Corynebacterium pyogenes*, *Pseudomona aeruginosa* y *Escherichia coli*, y con menor frecuencia *Actinomyces pyogenes*.

Los microorganismos invaden la glándula mamaria, por diferentes vías como la piel, la linfa y la sangre, la vía más común es la externa, penetrando por el canal del pezón.

El pezón es la primera línea de defensa contra la penetración de bacterias dentro de la ubre. Normalmente, el esfínter cierra el canal del pezón fuertemente cuando la vaca no es ordeñada. La invasión del pezón se presenta generalmente durante el ordeño. Los organismos presentes en la leche o en la punta del pezón son impulsados dentro del canal del pezón y de la cisterna cuando existe la entrada indeseable de aire en la unidad de ordeño (desprendimiento o pérdidas de la unidad o remoción de la pezonera sin haber antes cerrado el vacío).

Luego del ordeño, el canal del pezón permanece dilatado por una o dos horas e inclusive, el canal del pezón dañado puede permanecer parcialmente o permanentemente abierto. Los organismos del ambiente (materia fecal, cama, etc.) o aquellos que se encuentran en lesiones de la piel en la punta del pezón, pueden invadir fácilmente y abrir total o parcialmente el canal (Wattiaux, 2000).

Desde el punto de vista inmunológico la glándula mamaria de la vaca es un órgano incompetente, debido a la dilución que ejerce la leche sobre las

defensas inmunes, y a su escasa actividad fagocítica (Prescott y Baggot, 1991). Por ello, para que se produzca una adecuada respuesta inmune contra los patógenos a nivel de la glándula mamaria, es necesario que ocurra una integración entre la respuesta mediada por células y la mediada por anticuerpos y son las células presentadoras de antígenos (Macrófagos y linfocitos B) quienes se constituyen en artífices de esta integración (Quiroga, 1993).

Vacas que poseen ubres grandes, pendulares, esfínter relajado, que hayan sufrido traumatismos, sometidas a mal ordeño y alimentadas con una dieta rica en proteínas, son más propensas a padecer de mastitis (Agenjo, 1956).

Existen 2 formas de aparición de mastitis en un establo: la mastitis clínica y la mastitis subclínica; cuando los cambios son detectados a la inspección y la palpación hablamos de mastitis clínica y si no hay cambios detectables clínicamente se recurre a métodos de laboratorio y si salen positivos hablamos de mastitis subclínica (Andressen, 2001).

La mastitis subclínica es una inflamación de la glándula mamaria sin signos clínicos observables, tiene una alta incidencia en los rebaños lecheros de todo el mundo en los EEUU al menos el 40% de todas las vacas están infectadas con algún agente productor de mastitis en uno o más de sus cuartos (Philot, 1984).

Normalmente entre un 30% y 40% de vacas de un rebaño están infectadas por un patógeno potencial. El *Staphylococcus aureus* es el principal agente causante de mastitis, tanto de la mastitis clínica, como de la subclínica (Prescott y Baggot, 1991).

Escherichia coli ha sido involucrada en las mastitis más severas en animales, si bien la mastitis clínica muchas veces es intensa y grave, las pérdidas económicas más importantes se deben a la notable disminución de la producción lechera debido a mastitis subclínica (Prescott y Baggot, 1991).

La mastitis produce bajas de orden económico, siendo una enfermedad que muchas veces pasa inadvertida pero causa mucho más daño a la

ganadería que otras más temidas, el 50% de las hembras lecheras están afectadas de algún tipo de mastitis (Agenjo, 1956).

Las grandes pérdidas económicas al productor pueden deberse a las mermas en la producción de leche (70 % de total de las pérdidas) leche descartada (8%), medicina y gastos veterinarios (8%) y eliminación de animales que han perdido su capacidad productiva debido a la enfermedad (14%) (Ramírez, 1989).

La información estadística de varios países señala que la mastitis no ha disminuido en los últimos 30 años y que el 50% del ganado lechero se encuentra afectado como promedio en 2 de sus cuartos (Magariños, 2000)

La mastitis al ser un problema multifactorial es imposible de erradicar, su control depende de un sistema integral de medidas cuyos objetivos son:

- Reducir la tasa de nuevas infecciones.
- Reducir el tiempo de infección de cada caso de mastitis (Andressen, 2001; Magariños, 2000)

2.3 Tratamiento contra Mastitis

La mastitis al ser una enfermedad de origen bacteriano, requiere la utilización de productos antimicrobianos como los antibióticos para combatirla. La elección del antibiótico a utilizar dependerá del microorganismo involucrado, y el espectro de acción de dicho medicamento. El éxito en el tratamiento dependerá de la susceptibilidad de las bacterias al antibiótico utilizado y la duración del tratamiento; al respecto los expertos recomiendan se procure la utilización de antibióticos con baja tasa de residuos (Acebo, 2004).

Ciertos antibióticos se unen a los tejidos menores, los fármacos cuya distribución y absorción son más rápidas y que no fijan a los tejidos tienen una vida media corta y por ello su período de eliminación es la leche es corto, una vez absorbidos los antibióticos difunden desde la sangre a los cuartos que no han sido tratados (Prescott y Baggot, 1991).

La penicilina es el tratamiento de elección para las mastitis causadas por microorganismos gram positivos como los estreptococos y estafilococos no

resistentes; en el caso de bacterias gram negativas la estreptomina es el antibiótico recomendado. Actualmente se están desarrollando nuevos productos a base de antibióticos para combatir bacterias resistentes a las betalactamasas, de los cuales las cefalosporinas de cuarta generación es una de las más comunes (Acebo, 2004). En términos generales el uso de Betalactámicos es bastante común, estando distribuida su utilización en la mayoría de hatos lecheros.

Uno de los principales problemas al tratar vacas con antibióticos contra mastitis es la aparición de residuos de estas sustancias en la leche, por lo que los autores recomiendan respetar el periodo de retiro de cada uno de los antibióticos, el cual viene prescrito en el envase (Kir, 2003; Cabrera *et al*, 2005).

Cuando se trata una vaca, la leche se retiene hasta que este libre de residuos de la droga utilizada, ya que la presencia de estos residuos es una preocupación constante debido al riesgo de reacciones alérgicas, desarrollo de patógenos resistentes e inhibición de cultivos de productos como el queso y el yogurt (Cornell University, 2002).

A pesar del uso extensivo que se ha hecho de los antimicrobianos para el tratamiento de vacas productoras de leche en el momento del secado durante los últimos 20 años, no existen evidencias de desarrollo de resistencias vinculadas a los tratamientos en bacterias Gram positivas o Gram negativas. En este caso, debemos dejar claramente establecido que los tratamientos bovinos terapéuticos durante la lactación por casos de mastitis y profilácticos, durante el llamado “secado terapéutico” son siempre durante períodos de tiempo cortos.

Los tratamientos en lactación no se extienden durante más de 3 o 4 días como máximo, mientras que los tratamientos durante el período de secado mantienen concentraciones en la glándula durante períodos más largos, pero que, obviamente, no pueden superar el período en que la vaca no es ordeñada. Generalmente las concentraciones del antimicrobiano, se mantienen dentro de niveles inhibitorios un tiempo sensiblemente más corto que el período durante el cual la vaca no produce leche, con un rango de unos 15-60 días. Este es un

dato más a favor de la hipótesis de que se necesitan tratamientos muy prolongados para generar resistencias (Ziv, 1995).

2.3.1 Vías de administración de antibióticos

La vía intramamaria es la vía de elección para tratar mastitis de carácter benigno. En las mastitis agudas de carácter grave, se prefiere para el tratamiento la vía intramuscular, sin embargo, la distribución en la ubre de los antibióticos administrados por vía intramuscular se ve disminuida por la inflamación o por la obstrucción de los conductos galactóforos por productos de desecho (Prescott y Baggot, 1991). Algunos clínicos opinan que la administración intramamaria, sin administración sistémica, es preferible incluso en casos de mastitis grave (Prescott y Baggot, 1991).

Los preparados de administración intramamaria suelen tener poco volumen, ya que normalmente dicho volumen está entre los 4 y los 10 ml. esto determina en parte la duración de su período de eliminación. Este es un factor importante de tener en cuenta ya que la leche se desecha por contener antibiótico, siendo esto es una causa importante de pérdida económica (Prescott y Baggot, 1991).

La administración oral, intramuscular o intravenosa, tiene menos importancia que la vía intramamaria desde el punto de vista de higiene de la leche, siendo esta última la más usada para el tratamiento contra mastitis. La cantidad de antibióticos eliminada por la leche dependerá mucho del tipo de preparado, dosis, intervalos entre tratamientos, ordeño, número de ordeños, nivel de producción de leche y factores individuales (Magariños, 2000).

La administración de antibióticos por vía parenteral puede subsanar inconvenientes por la obstrucción de los conductos galactóforos aunque casi siempre después de una administración parenteral, también suelen administrarse simultáneamente por vía intramamaria (Prescott y Baggot, 1991).

2.4 Antibióticos

Los antimicrobianos son sustancias que se obtienen por síntesis o naturalmente a partir de los cultivos de microorganismos. Mediante modificaciones de la estructura química de un agente obtenido naturalmente, es posible producir agentes semisintéticos.

Durante los últimos 50 años, el énfasis en el incremento de la producción de leche ha conllevado al uso de varios antimicrobianos incluyendo los betalactámicos, tetraciclinas y sulfonamidas en el tratamiento de la mastitis y otras enfermedades (Harth y Steele, 2001)

El primer antibiótico natural fue la penicilina (1928), que es el ejemplo excluyente, al representar el primer escalón de un grupo enorme de drogas de gran actividad y uso extendido, y el inicio de una nueva etapa en la historia de la humanidad. A partir de la molécula de la penicilina se semi-sintetizaron muchos otros agentes, en la búsqueda de mejorar ciertas características que parecían deficitarias del antibiótico original. Así aparecieron las penicilinas ácido-resistentes, que se pueden administrar oralmente sin ser inactivadas por el ácido gástrico de los animales monogástricos y del hombre, como la penicilina V. También aparecieron las penicilinas penicilinasa resistentes, con capacidad de resistir el ataque de bacterias resistentes, productoras de enzimas que pueden inactivar la molécula madre, como es el caso de cloxacilina y meticilina. Se actuó, además sobre el espectro, que en el caso de la penicilina es relativamente estrecho. Así aparecieron ampicilina y amoxicilina, por ejemplo, drogas sintéticas que son capaces de actuar sobre una variedad de bacterias sustancialmente mayor que la penicilina (Errecalde, 2004).

En los años siguientes, comenzaron a descubrirse nuevas drogas. Se transcriben algunos de los hallazgos más trascendentes: En la década del 40 estreptomicina, cloranfenicol y clortetraciclina. En la década del 50 eritromicina y vancomicina. En la del 60, gentamicina, ampicilina, cefalotina y amikacina. En la del 70, cefalexina, carbenicilina, cefoxitina y cefaclor. En la del 80, cefotaxima, moxalactam, combinación ácido clavulánico-amoxicilina, combinación imipenem-cilastatina, aztreonam. En los 90 aparecen las

fluoroquinolonas, nuevos macrólidos, nuevas cefalosporinas y agentes antivirales más efectivos. Luego del 2000 registramos la aparición de quinolonas de espectro ampliado (Errecalde, 2004).

Los agentes antimicrobianos actúan mediante una serie de mecanismos, muy diferentes entre ellos y cuyos blancos se encuentran en diferentes regiones de la célula atacada. Las diversas regiones de ataque antibacteriano en general son consideradas: pared bacteriana, membrana bacteriana, Síntesis de proteínas, y la síntesis de ácidos nucleicos (Ariens, 1964).

2.4.1 Betalactámicos

Los betalactámicos son una familia de drogas que atacan la pared bacteriana, ejerciendo su efecto a través del bloqueo de su síntesis. Interfieren con la síntesis de peptidoglicano, elementos esenciales de la constitución de la pared. Los defectos de la pared celular llevan a la lisis bacteriana. Actúan solamente frente a microorganismos que están en crecimiento activo (Sumano, 1997).

Los componentes del peptidoglucano se sintetizan en el citoplasma y son transportados a través de la membrana citoplasmática al espacio que existe entre ésta y la pared celular. A este nivel existen unas proteínas con actividad enzimática (transpeptidasas y carboxipeptidasas), que son las encargadas de formar los tetrapéptidos unidos. Estas enzimas fijan a las penicilinas y otros betalactámicos, por lo que se llaman PBP (Protein Binding Penicilin). La función de las PBP es alargar, dar forma y dividir la bacteria. Los anillos de los betalactámicos poseen una estructura similar a los dos últimos aminoácidos del pentapéptido (D-alanina-D-alanina) y eso permite una unión covalente en el lugar activo de la transpeptidasa. También pueden inhibir a las carboxipeptidasas y algunas endopeptidasas (Marin y Gudíol, 2003).

La presencia de un anillo betalactámico define químicamente a esta familia de antibióticos, de la que se han originado diversos grupos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenemas, monobactamas e inhibidores de las betalactamasas.

Cuadro N° 5 Clasificación química de los Betalactámicos, modo de acción y espectro simplificados.

GRUPO	MIEMBROS	MODO DE ACCION	ESPECTRO
PENICILINAS	Inhiben síntesis de pared celular	Penicilina G Penicilina V Cloxacilina Ampicilina Carbenicilina	Bacterias Gram + Idem Estafilococos productores de penicilinasa Bacterias Gram + y Gram- <i>P. aeruginosa</i>
CEFALOSPORINAS	Inhiben síntesis de pared celular	Cefalodirina Cefalexina Cefuroxima Moxalactam Ceftiofur Cefoperazona Cefepina	Bacterias Gram + y Gram- Bacterias Gram + y Gram- sobre todo estafilococos productores de penicilinasa Bacterias Gram + y Gram- con menos actividad frente a Gram+ y mas frente a Gram- Bacterias Gram+ y enterobacterias Idem <i>Pseudomona aeruginosa</i> Estafilococos y enterobacterias
INHIBIDORES DE LA BETALACTAMASAS CLAVAMAS	Se une a la betalacta-masa inactivando-la	Ácido Clavulónico Sulbactam Tazobactam	Bacterias productoras de betalactamasas
CARBAPENEMAS	Inhiben síntesis de pared celular	Imipenem Cilastatina	Gram + y Gram – aerobios y anaerobios
MONOBACTAMAS	Inhiben síntesis de pared celular	Aztreonam	Gram negativos

Las penicilinas son un grupo de antibióticos que contienen un anillo betalactámico y un anillo de tiazolidina, formando el ácido 6-aminopenicilánico, estructura que deriva de la condensación de una molécula de valina y una de cisterna para dar lugar al doble anillo característico. Además tienen una cadena lateral, que varía de unas penicilinas a otras en la posición 6 del anillo betalactámico y que es la que define sus propiedades (Sumano, 1997).

Las cefalosporinas son fármacos estructuralmente similares a las penicilinas, cuya estructura básica está constituida por el núcleo cefem, que consiste en la fusión de un anillo dihidrotiacínico (en lugar del anillo tiazolidínico

característico de las penicilinas) y un anillo betalactámico. La introducción de modificaciones en las cadenas laterales origina las diversas Cefalosporinas (Marin y Gudiol, 2003).

En el momento actual únicamente se emplean en clínica inhibidores de las betalactamasas de estructura química betalactámica. El ácido clavulánico tiene un núcleo similar al ácido penicilánico de las penicilinas con la sustitución del átomo de azufre en posición 3 por un átomo de oxígeno (que incrementa la reactividad de la molécula y proporciona una afinidad mayor por las betalactamasas), y la falta de la cadena lateral acilamino en posición 6. El sulbactam es una sulfona semisintética del ácido penicilánico. El tazobactam se diferencia del sulbactam por la presencia de un grupo triazol en posición 3.

La estructura básica de las carbapenemas consiste en un anillo betalactámico fusionado a uno pirrolidínico compartiendo un nitrógeno. Estas modificaciones y las cadenas laterales, así como la posición espacial de éstas, condiciona la mayor afinidad por las proteínas fijadoras de penicilina (PBP) diana, un incremento de la potencia, del espectro antibacteriano y de la resistencia a las betalactamasas, siendo los betalactámicos de más amplio espectro y actividad (Marin y Gudiol, 2003).

Los monobactámicos son derivados del ácido 3-aminomonobactámico (3-AMA). Tienen una estructura betalactámica sencilla con una estructura monocíclica en la que el anillo betalactámico no está fusionado a otro secundario.

Cuadro Nº 6: Principales productos a base de Betalactámicos de uso pecuario comercializados en el Perú

NOMBRE COMERCIAL	PRINCIPIO ACTIVO	ESPECIES	PERIODO DE RETIRO
Amoxil Retard	Amoxicilina trihidrato	Bovinos, ovinos y porcinos	
Benzatard	Penicilina G procaínica Penicilina G benzatínica	Bovinos, ovinos, porcinos y caprinos	
Biosuspen	Penicilina G procaínica Penicilina G benzatínica Dihidroestreptomicina	Bovinos y porcinos	
Dexabiopen	Penicilina G procaínica	Bovinos y porcinos	

Mamicur	Cloxacilina sódica	Vacas en lactación	
Pendistrep	Penicilina G procaínica Dihidroestreptomicina	Bovinos, ovinos y porcinos	
Ubrisec	Cloxacilina Neomicina	Vacas lecheras en período de seca	
Amoxivet oral	Amoxicilina Ácido nalidíxico	Bovinos, ovinos, aves porcinos y caprinos	
Amtevet	Ampicilina sódica	Aves, porcinos y rumiantes	
Penfort reforzado	Penicilina G benzatínica Penicilina G procaínica Penicilina G potásica		
Ampi-kel 20% inj	Ampicilina		
Cloxin TS inyector	Cloxacilina sódica, Neomicina		
Combi-kel 40	Bencilpenicilina	Bovinos, porcinos, ovinos y caprinos	
Chanamast	Ampicilina Cloxacilina		
Drycloxa-gel	Cloxacilina		
Mastivexym forte	Framicetina Bencilpenicilina sódica		
Peni-kel 15+15 L.A.	Bencilpenicilina benzatínica Bencilpenicilina procaínica		
Penikan P	Sulfato de kanamicina Bencilpenicilina procaínica		
Veyxyl L.A. 200	Amoxicilina	Bovinos, ovinos y porcinos	
Veyxyl pellet	Amoxicilina	Bovinos, ovinos y porcinos	*sólo con receta médica
Mamintral Lactación (suspensión intramamaria)	Cloxacilina (sal sódica) Ampicilina (sal sódica)	Bovinos, ovinos porcinos y caprinos	Período de retiro: 2 días (4 ordeños)
Mamintral Secado	Cloxacilina (benzatina) Ampicilina (trihidrato)	Vacas en seca	
Estreptomont	Penicilina G sódica Penicilina G procaínica Dihidroestreptomicina		Período de retiro en carne y leche: 5 días
Kanamont mastitis	Kanamicina, Penicilina G procaínica, Furazolidona		Período de retiro en leche: 22 días
Ultrabiot	Penicilina G procaínica Dihidroestreptomicina	Bovinos, ovinos, porcinos	Período de retiro en carne y leche: 5 días
Ceftiofur pharmavet	Ceftiofur	Bovinos y porcinos	
Dufamox 15%	Amoxiciclina trihidrato	Bovinos y porcinos	Período de retiro en carne y leche: 42 y 3 días

			respectivamente
Dufapen 20/20	Bencilpenicilina procaínica Dihidroestreptomicina		Período de retiro en carne y leche: 30 y 4 días respectivamente
Cloxomast MA	Cloxacilina sódica Estreptomicina		Período de retiro en carne y leche: 15 días y 48 horas respectivamente
Pentagal reforzado	Penicilina G procaínica, Penicilina G benzatínica Penicilina G sódica Dihidroestreptomicina Estreptomicina	Bovinos y cerdos	Período de retiro en carne y leche: 5 días
Cevalexin	Cefalexina	Bovinos	
Cebamos	Amoxicilina		
Excenel sódico	Ceftiofur	Porcinos y bovinos	
Extimox-50	Amoxicilina trihidratada	Aves y cerdos	
Espen 50	Estreptomicina Penicilina G	Bovinos, ovinos, caprinos y porcinos	
Penicilina G	Penicilina G sódica Penicilina G potásica	Animales grandes y medianos	
Microflud Ceft	Ceftiofur base	Bovines, porcinos aves	
Albipen LA	Ampicilina anhidra	Bovinos, ovinos, caprinos y porcinos	
Metricure	Cefapirina	Metritis bovina	Período de retiro en carne y leche: 48 y 0 horas respectivamente
Nafpenzal DC	Penicilina procaínica Dihidroestreptomicina Nafcilina	Mastitis al secado	Para un tiempo de seca de 60 días no se necesita período de retiro
Nafpenzal	Penicilina sódica, Nafcilina Dihidroestreptomicina	Mastitis en período de lactación	Período de retiro en leche: 3 días (6 ordeños)
Neomastitar	Penicilina procaínica Neomicina base	Vacas en período de seca	No necesita período de retiro
Pencivet LPU	Penicilina G procaínica Penicilina G benzatínica Dihidroestreptomicina	Bovinos, ovinos, caprinos y porcinos	Período de retiro en carne y leche: 30 días y 120 horas (8 a 10 ordeños)
Pencivet Super Fuerte	Penicilina G benzatínica Penicilina G procaínica Penicilina G potásica Estreptomicina	Bovinos, porcinos y ovinos	Período de retiro en carne y leche: 30 días y 72 horas respectivamente
Cefalur	Ceftiofur sódico	Aves	
Megapen LA	Penicilina G procaínica Penicilina G benzatínica		
Gen-A-Pen suspensión	Penicilina G procaínica Dihidroestreptomicina	Bovinos, cerdos, ovinos y caprinos	

Masticen Pomada	Cloxacilina sódica Ampicilina	Bovinos, ovinos, caprinos	
Masticen secado	Cloxacilina benzatínica Ampicilina trihidrato		
Clamoxyl LA	Amoxicilina	Bovinos, ovinos y porcinos	
Orbenin Extra Dry Cow	Cloxacilina benzatínica		No utilizar en animales de lactancia
Betamox LA	Amoxicilina	Vacunos, ovinos y cerdos	
Bovaclox (Dry cow)	Cloxacilina Ampicilina		No usar en vacas con período de seca muy cortos. No consumir leche dentro de 96 horas después del parto Períodos de retiro: 30 días más 96 en leche y 28 días en carne
Lactaclox	Ampicilina Cloxacilina		Período de retiro en carne y leche: 7 días y 60 horas (al 5º ordeño) respectivamente
Multiject IMM	Penicilina G procaínica Estreptomina Neomicina	Vacas en lactación	Período de retiro en leche: 72 horas (al 6º ordeño)
Opticlox Eye	Cloxacilina	Vacunos, ovinos y camélidos	
Stre pen 25/20	Penicilina procaínica Dihidroestreptomina	Vacunos, cerdos y ovinos	Período de retiro en carne y leche: 18 días y 60 horas respectivamente
Estreptopen	Penicilina G procaínica Penicilina G sódica Penicilina G benzatínica	Bovinos, porcinos, ovinos y caprinos	
Minoxel	Ceftiofur	Bovinos, porcinos y aves	
Benzatina G LA	Penicilina G potásica Penicilina G procaínica Penicilina G benzatínica Dihidroestreptomina	Bovinos, caprinos, cerdos, y camélidos	
Mastiretard	Cloxacilina benzatina	Vacas en seca	
Streptopen	Penicilina G procaínica Penicilina G potásica Estreptomina		Período de retiro en carne y leche: 30 y 4 días respectivamente
Sumavic SAC	Amoxicilina	Aves y cerdos	
Cloxacum	Cloxacilina		Período de retiro en

			carne y leche: 28 días
Cloxambiotic	Cloxacilina Ampicilina	Bovinos, ovinos y caprinos	
Noramox	Norfloxacin Amoxicilina	Aves y cerdos	
Ceftocidin	Cefalexina Neomicina	Vacas lecheras	Período de retiro en leche: 6 ordeños
Ceftocidin seco	Cefalexina Neomicina Penicilina procaínica		
Tercidon	Penicilina G procaínica Penicilina G benzatínica Dihidroestreptomicina	Bovinos, ovinos y cerdos	Período de retiro en carne: 30 días No utilizar en vacas cuya leche es destinada a consumo humano
Ubret DC	Cloxacilina Ampicilina	Terapia del secado en vacas	Período de retiro en leche y carne: 4 y 28 días
Vetmoxil 60%	Amoxicilina 60%		

El metabolismo de la mayoría de betalactámicos es casi nulo, manteniéndose en forma activa hasta su eliminación renal (Bishop, 2004). En algunos preparados predomina la excreción por vía biliar (cefoperazona, ceftriaxona). Muy pocos sufren metabolismo, como la desacetilación (cefalotina, cefotaxima) o la inactivación por las hidroxipeptidasas renales (imipenem) (Marin y Gudiol, 2003).

Los betalactámicos son antibióticos de actividad bactericida lenta, relativamente independiente de la concentración plasmática alcanzada, siempre que ésta exceda la concentración inhibitoria mínima (CIM) del agente causal (Drussano, 1988).

La actividad bactericida y probablemente la eficacia clínica se relacionan mejor con el tiempo durante el cual dicha concentración excede la CIM ($T > CIM$) (Vogelman *et al.* 1988). Para la mayoría de infecciones se considera adecuado que el tiempo que supera la CIM sea como mínimo del 40% del intervalo entre dosis; pero en pacientes neutropénicos o con meningitis es

probable que sea mejor estar todo el tiempo por encima de la CIM (Marin y Gudiol, 2003).

Las bacterias pueden desarrollar resistencia a los betalactámicos por varios mecanismos, que en ocasiones se asocian. El control genético de estos mecanismos puede ser cromosómico, plasmídico o por transposones. La resistencia cromosómica aparece por mutación, mientras que los plásmidos y los transposones pueden ser autotransferibles entre bacterias (Poole, 2001).

Los antibióticos betalactámicos son de amplia utilización en terapia de vacas con mastitis, un número significativo de trazas de las drogas continúan persistiendo en la mama durante 4 a 5 días posteriores a la dosificación, dependiendo de la formulación indicada; en la terapia local es común que muchos productores utilicen varias dosis en los animales afectados con la finalidad errónea de acelerar la recuperación del animal, generando un incremento de residuos en leche; incluso el uso de las formulaciones de “larga acción”, generan la presencia de residuos en leche que puede llegar a una semana (Carreto, 2005).

2.5 Residuos de antibióticos

La utilización de antibióticos en los animales destinados al consumo humano esta muy extendida, tanto en el tratamiento y prevención de las enfermedades infecciosas, como en la estimulación de su crecimiento. Esta utilización requiere que se respeten unos tiempos de espera o periodos de supresión, antes de emplear la producción de leche, huevos y carne de animal, de manera que no permanezcan en estos productos los residuos del fármaco empleado (Bermudez *et al*, 2006).

El valor residual que poseen los antibióticos es un punto importante a tener en cuenta al momento de elegir el tratamiento adecuado, ya que la aparición de residuos de antibióticos en los alimentos de origen animal es perjudicial para el hombre. Al respecto, distintos organismos a nivel mundial han fijado los MRLs, que es el límite máximo de residuos que se puede aceptar en un determinado alimento para que un humano que lo consume en forma normal y abundante no

supere el nivel de ingesta máximo admisible (ADI) para la droga en cuestión (Errecalde, 2004).

El nivel de ingesta máximo admisible es determinado en animales de laboratorio, luego de administrarles el medicamento en el alimento durante períodos prolongados de tiempo; y se refiere a la máxima cantidad del medicamento que la especie experimental puede recibir sin ningún tipo de manifestación toxicológica. Posteriormente, se extrapola a los humanos aplicándole un factor de seguridad (Craig, 1998).

En el caso de los antibióticos betalactámicos, el efecto post-antibiótico (EPA), es decir la acción residual del antibiótico sobre la bacteria después de descender las concentraciones terapéuticas en la sangre y los tejidos por debajo de la CIM; es de corta duración, con la excepción de los carbapenémicos, que presentan un EPA apreciable tanto sobre gram-positivos como sobre gram-negativos (Spivey, 1992).

Estos parámetros indican que alargar los intervalos entre dosis puede llevar a fracasos terapéuticos. Obviamente estas consideraciones no son válidas en el caso de betalactámicos con semivida muy prolongada, que se administran cada 24 horas, como la ceftriaxona (parenteral) o la cefixima (oral) (Marin y Gudiol, 2003),

Sánchez y *col.* (2001) realizaron un estudio para determinar residuos de antibióticos en leche de vacas en cooperativas ganaderas encontrando que de 95000 muestras de leche de tanque analizadas 175(0.18%) muestras presentaron residuos de antibióticos y que de estas el 79 fueron debidas a antibióticos Betalactámicos.

2.5.1 Residuos de antibióticos en leche

El uso masivo e indiscriminado de antimicrobianos facilita la presencia de residuos en los productos destinados a consumo humano especialmente, huevos, leche y carne (Ortega, 1988).

El uso de antimicrobianos en el tratamiento animal es una práctica frecuente en las ganaderías. En EE.UU. de NA el 76% de las vacas de lechería habría recibido alguna vez antibiótico en alguna etapa de su vida (Hays, 1986).

En los mamíferos, una de las vías de eliminación de los antimicrobianos y sus metabolitos, es la leche. El tiempo de eliminación de estos residuos es variable dependiendo del animal y del fármaco aplicado (Rodríguez y Rodríguez, 1995).

Los medicamentos llegan a la leche, tanto por vía intramamaria como por vía parenteral y se eliminan por ésta vía de acuerdo con características individuales de orden fisicoquímico, en función del número de días que duró el tratamiento y dada la naturaleza del vehículo o excipiente que lo contiene (Francklin *et al*, 1986; Archimbault *et al*, 1980).

Los medicamentos que generalmente se aplican por vía intramamaria son antibacterianos y debe distinguirse entre preparados de uso intramamario para el tratamiento de mastitis y preparados utilizados para el secado de una vaca. En el primer caso la eliminación es más rápida y por lo tanto los medicamentos utilizados para el secado de las vacas no deben utilizarse con fines terapéuticos. Otro punto importante a considerar en el retiro de los animales de la ordeña es que las recomendaciones de los fabricantes en cuanto a retiro de los animales de la línea de producción son siempre menores que los tiempos reales necesarios para que se elimine completamente el fármaco; De manera general se ha estimado que el promedio de horas necesarios para que desaparezcan los residuos es de 168 horas después del último tratamiento intramamario, con un máximo de 214 horas. Es importante observar que éste es un largo periodo de retiro por lo que deberá limitarse la aplicación intramamaria a los casos clínicos que verdaderamente lo ameritan (Allison, 1998).

Existe correlación negativa entre el tiempo de eliminación del antibiótico y el volumen de leche producido por el animal, los de baja producción demoran en excretar el preparado, principalmente por la mala absorción y secreción de los cuartos afectados, el ordeño frecuente aumenta el efecto de dilución y por lo tanto, acorta el tiempo de eliminación del antibiótico (Magariños, 2000).

La presencia de residuos de antimicrobianos en la leche se debe principalmente a la falla en el tiempo de retención luego de realizar un tratamiento terapéutico, ya sea por mastitis u otro tipo de condición (Shahani y Whalen, 1986).

En un estudio realizado en Gran Bretaña se determinaron como posibles causas que pueden contribuir a la presencia de antimicrobianos en leche: una incorrecta anotación de tratamiento, no desechar la leche por el periodo de tiempo recomendado, un parto prematuro que acorta el periodo de secado, una mezcla fortuita de leche contaminada, contaminación cruzada de envases con leche con residuos de antibióticos, solo desechar la leche del cuarto tratado y la falta de información del tiempo de supresión de cada antibiótico (Booth, 1982).

Se debe tener en cuenta que no sólo la leche de los cuartos tratados es lo que se contamina se ha comprobado actividad antibiótica en los cuartos vecinos no tratados, esto se puede dar por difusión pasiva entre la sangre o la leche o por difusión directa entre los tejidos y la leche (Magariños, 2000).

Otra forma de contaminación de la leche se produce cuando se utilizan máquinas ordeñadoras u otros equipos que contengan trazas de residuos de antimicrobianos luego del ordeño de animales tratados con estos fármacos (Booth, 1998).

Knappstein *et al.* (2003), realizaron un estudio en el cual indicaron que la diferencia en la frecuencia de ordeño en sistemas automatizados podría influir en la excreción de drogas veterinarias de vacas que fueron tratadas con antimicrobiales. Para ello, se utilizaron dos antimicrobianos betalactámicos de uso generalizado en Europa: cefquinona y penicilina; además, se establecieron tres diferentes frecuencias en el ordeño: 3 (cada 8 horas), 2 (cada 10 – 14 horas) y 1,5 (cada 16 horas) al día. Los resultados obtenidos mostraron que en los animales tratados con cefquinona la frecuencia de ordeño no influía en la disminución de residuos en leche; mientras que en los tratados con penicilina, el tiempo requerido para que los residuos de antimicrobianos disminuyeran dentro de los límites aceptados, se incrementaba a medida que la frecuencia de ordeño disminuía.

En la industria lechera se ha estimado que la leche proveniente de una vaca que ha sido tratada con 200mg de penicilina tiene el potencial de contaminar la producción láctea de hasta 8000 vacas si ésta es mezclada dentro de un tanque contenedor (Crawford y Franco, 1994; Booth, 1998).

Debido al uso extendido de la penicilina G procaínica en ganado, Musser *et al.* (2001), realizaron un estudio cuyo objetivo fue determinar la presencia de residuos de este antibiótico en suero y orina de terneros que recibieron leche que contenía penicilina G y amoxicilina. Aunque usada en menor grado en ganado, los autores decidieron examinar además la amoxicilina debido a que posee mejor disponibilidad oral en comparación con la penicilina. Los resultados obtenidos demostraron que tanto la penicilina G como la amoxicilina tienen el potencial de producir residuos de corta duración en terneros.

En el Reino Unido la fuente de contaminación de leche con antimicrobianos es mayormente por preparaciones intramamarias lactacionales (61%), preparados intramamarios para el periodo de seca (31%), administración parenteral e intrauterina (6%), y otros (Booth, 1998).

En el 1998, la agencia del gobierno británico que monitorea los niveles residuales de drogas veterinarias, Veterinary Medicine Directorate (VMD), realizó un programa de vigilancia nacional de la leche encontrando que de 1007 muestras tomadas sólo 2 resultaron positivas a la presencia de residuos de antimicrobiales (Hunt, 1999).

En otro estudio realizado en Deza, Galicia, se determinó la presencia de residuos de antimicrobianos (cloranfenicol y estreptomina) en leche. En este estudio se tomaron muestras de 302 establos lecheros de los cuales un 5,62% resultó positivo a estreptomina y un 15,89% a cloranfenicol (Rodríguez y Rodríguez, 1995). Según los autores, los factores probables que hayan permitido la aparición de estos residuos fueron tratamientos prolongados, mal manejo de tratamientos, desconocimiento de los periodos de retiro como el desechar solamente la leche del cuarto tratado, ignorar que los antimicrobianos aplicados por otras vías diferentes pueden ser eliminados por la leche y las respuestas individuales en la eliminación del antibiótico.

En nuestro país, en un estudio realizado por Llanos (2002) se determinó la presencia de residuos de antimicrobianos en leche fresca, en la ciudad de Cajamarca. Las muestras de leche se tomaron de mercados, tiendas y algunos fundos de ésta ciudad. Las pruebas utilizadas fueron los métodos cualitativos del cultivo de la cepa *Bacillus stearothermophilus* y la prueba de difusión estándar Delvotest. Los resultados obtenidos mostraron que de 150 muestras provenientes de mercados, 31 (20,67%) resultaron positivas y de 66 muestras obtenidas en fundos y tiendas, 14 (21,21%) resultaron positivas. En total, 45 muestras de un total de 216 resultaron positivas a residuos de antimicrobianos,

Gutiérrez (1962) realizó en Lima, Callao y balnearios un estudio cuyo objetivo fue detectar residuos de antibióticos en leche comercializada en dicha área. Para éste fin tomó 250 muestras de leche las cuales fueron analizadas utilizando la prueba del disco de Kosikowski (con cepa de *Bacillus subtilis*) y el método de coagulación. Encontrando que solo dos muestras (0.08%) fueron positivas al método del disco y no coagularon pasadas las 24 horas.

2.5.2 Importancia en Salud Pública

Es conocido que prácticamente toda la leche que consume la población peruana contiene grandes cantidades de diversos antibióticos provenientes tanto de tratamiento intramamario como del tratamiento intrauterino e inyectable (Andresen, 2000).

La presencia de residuos de antibióticos en leche representa un grave problema de salud pública, ya que, a pesar de que la leche es pasteurizada este proceso lo único que evita es la presencia de microorganismos resistentes pudiendo haber residuos de antibióticos en este producto (Diez y Calderon, 1998)

Uno de los problemas que ocasiona en el ser humano el antibiótico presente en leche son las reacciones alérgicas que se producen luego de un período de sensibilización, en el cual se generan anticuerpos contra la droga que actúa como antígeno. Un individuo sensibilizado puede presentar cuadros alérgicos al consumir leche contaminada esto sucede con varios antibióticos.

También puede producir los siguientes efectos en el consumidor: alteración de la flora intestinal, estimulación de bacterias antibióticas – resistentes, desarrollo de microorganismos patógenos y reducción de la síntesis de vitaminas (Magariños, 2000).

El consumo de productos animales con residuos de antibióticos puede producir los mismos efectos perjudiciales que si se administrara de forma directa una dosis equivalente, pudiendo producir reacciones alérgicas en individuos sensibles (Diez y Calderon, 1998).

La mayor información sobre reacciones de hipersensibilidad se refiere a las penicilinas naturales y semi-sintéticas pues son los antibióticos de mayor uso tanto en medicina humana como veterinaria. Se estima que alrededor de un 4 a 7% de la población es hipersensible a la penicilina (San Martín, 1995).

El principal efecto desde el punto de vista sanitario, es el desarrollo de resistencia bacteriana que se puede extender de unos microorganismos a otros pasando de los animales al hombre (Diez y Calderón, 1998).

La transferencia de resistencia entre animales y seres humanos obligan a los diversos profesionales involucrados en la materia a mejorar el uso responsable de los antibióticos para el tratamiento de animales (OIE, 2001). Al respecto, la Organización Mundial de la Salud, recomienda no usar drogas que se empleen en tratamiento de humanos para la industria animal (Low y Esquivel, 2002).

Una alternativa para evitar la presencia de residuos de antibióticos en leche es ampliar los períodos de supresión de todos los antibióticos preparados de administración intramamaria ya que el efecto de dilución de la leche de mezcla significa que no se detecten los contenidos insignificantes que son agregados después de los períodos de supresión fijadas para cada antibiótico (Prescott y Baggot, 1991).

Es importante, entonces la calidad de elaboración y control de antimicrobianos para una terapéutica exitosa y la defensa de la salud pública, considerando que la implementación de procedimientos armonizados en el registro (tal como OIE viene trabajando en América a través del programa

CAMEVET), buenas prácticas de manufactura (GMP) en la elaboración de medicamentos y buenas prácticas de laboratorio en el desarrollo y control de los mismos son esenciales y se debe seguir avanzando en ese sentido (Errecalde, 2003).

2.5.3 Importancia en Industria de productos Lácteos

La industria de productos lácteos fermentados es la más afectada cuando la leche presenta residuos de antibióticos, provocando grandes pérdidas en la calidad y por ende económicas. Las bacterias implicadas en la producción del yogurt son menos eficaces, produciéndose cambios morfológicos en el producto y pueden darse casos en que los cultivos microbiológicos sean reemplazados por microorganismos indeseables provocando la inutilización del producto o que se convierta en peligroso para su consumo. También se ven perjudicados en pruebas de calidad como la del tiempo reducción, del azul de metileno que aumenta con la pérdida de residuos de antibióticos o que trae un error en la clasificación de la leche (Magariños, 2000).

La leche generalmente se pasteuriza y aunque es poco probable que contenga bacterias resistentes, puede tener residuos de antibióticos por haber recibido el ganado tratamientos terapéuticos, la presencia de estos residuos puede inhibir el crecimiento de los microorganismos requeridos para la fabricación de queso o yogurt (Diez y Calderón, 1988).

Los tratamientos térmicos no destruyen las sustancias inhibidoras ni los antibióticos, según un informe de la Federación Internacional de la Leche, señala que la penicilina solamente pierde 87 de su actividad a la pasteurización, un tratamiento térmico más exigente (90°C por 30 minutos) destruye el 20% de la actividad de esta y la esterilización un 50 % otros efectos provocados por los residuos de antibióticos en la industria de productos fermentados y quesos.

En general, la presencia de residuos de antibióticos en leche destinada a la industria de lácteos, como el queso, trae las siguientes consecuencias: demora

la acidificación, demora de la coagulación, disminuye la retención de agua, promueve el desarrollo de microorganismos indeseables, interfiere en la formación de aveno en mantequilla fermentada, y altera las características principales del producto, provocando un cuerpo débil con sabor amargo (excesiva acción cuajo) y una textura blanda (consistencia arenosa del yogurt) (Magariños, 2000).

2.6 Antibióticos y Resistencia

Clásicamente la presencia de antimicrobianos en alimentos se ha asociado a distintos problemas, como las alergias, la toxicidad y las resistencias bacterianas. Los problemas alérgicos son conocidos y afectan a la población sensibilizada. En general las bajas concentraciones de antibióticos alergénicos (i.e. betalactámicos) no alcanzan para sensibilizar pacientes aunque puede haber excepciones), pero sí para desencadenar reacciones que, en general, no son graves, aunque, eventualmente, pueden llegar a serlo (anafilaxia) (Errecalde, 2004).

Algunos otros grupos de antibióticos son capaces de desencadenar reacciones alérgicas como las sulfamidas. De todas maneras siempre hay un componente fuertemente individual en estas reacciones que está representado por el terreno inmunológico del paciente.

Los problemas toxicológicos, por su parte, son bastante difíciles de probar, dadas las bajas concentraciones residuales de estas drogas. El que sí es capaz de dar lugar a problemas tóxicos, es el cloranfenicol, y a dosis probablemente muy bajas. El cloranfenicol es capaz de producir dos tipos de manifestaciones toxicológicas: a. Una mielo depresión dosis dependiente que se presenta en el curso de un tratamiento con la droga y b. Una anemia aplásica, que es dosis independiente, que desarrolla en individuos susceptibles, y que es irreversible una vez instalada. Esta es la razón de que el cloranfenicol haya sido prohibido en algunos países, pero no haya ocurrido lo mismo con los otros fenicoles (Errecalde, 2004).

El uso masivo e indiscriminado de antimicrobianos trae consigo algunas consecuencias negativas como es la generación de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos (Okolo, 1986)

El fenómeno de resistencia a la penicilina fue descubierto poco tiempo después de su descubrimiento, sin embargo fue tomado más como una curiosidad que como un hecho clínico de trascendencia. Sin embargo, en la década del 50 las resistencias a la penicilina adquieren peso clínico, se toma total conciencia del fenómeno. En los 60, los estafilococos meticilino-resistentes y *Pseudomonas* gentamicino-resistentes confirman la gravedad del cuadro. En los 70 las resistencias a ampicilina se hacen frecuentes. En los 90 aparecen cepas de enterococos resistentes a ampicilina y en el caso de *M. tuberculosis*, que ya presentaba variedades resistentes a algunos tuberculostáticos, aparecen cepas multirresistentes (Marin y Guidol, 2003).

La leche con residuos de antibióticos ingerida por lactantes puede provocar en ellos una antibioresistencia que va a provocar dificultades en el tratamiento de infecciones ulteriores. El antibiótico en leche inhibe los fermentos lácticos y produce una proliferación de gérmenes nocivos (colibacilosis) esto hace a la leche muy difícil de trabajar industrialmente (Veisseyre, 1980)

Por ejemplo, la Food and Drug Administration de los Estados Unidos de Norte América a partir de 1956, calculó que el 10% de la población estadounidense resultaba hipersensible a la penicilina y que aproximadamente el 5% de la leche utilizada en ese país contenía antibióticos (Ocampo, 2006).

El mal uso de antibióticos va a tener como consecuencia el desarrollo de gérmenes multirresistentes y es muy importante saber interpretar los resultados con los antibiogramas (Valdez, 2003).

La utilización racional de antibióticos en establecimientos productores de leche a efectos de optimizar sus acciones previniendo efectos en la salud pública debe ser una prioridad. Para esto, se ha insistido, a través de diversos documentos y reuniones de entrenamiento, en que se deben poner en práctica

planes de administración adecuados, respetándose los períodos de retirada correspondientes a cada formulación (Errecalde, 1994, 1996; Mestorino, 2001)

2.7 Legislación sanitaria

Los posibles efectos tóxicos de los residuos de medicamentos veterinarios y plaguicidas en la leche y derivados han llevado a las autoridades sanitarias de los países a establecer, límites máximos de estos residuos (LMR) para poder garantizar la inocuidad de este importante alimento. A nivel internacional la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), han formado un programa conjunto a través del Codex Alimentarius, para establecer y recomendar los LMR de medicamentos de uso veterinario y plaguicidas en leche. Cada país implanta sus propias regulaciones al respecto; se ha observado que en países donde se tienen programas periódicos de seguimiento de residuos en leche se ha logrado disminuir su incidencia (Honkanen y Reybroek, 1997).

Según la FAO, el LMR define el nivel máximo de residuos de cualquier componente de una droga veterinaria que pueda estar presente en alimentos de origen animal sin que estos niveles signifiquen un peligro para el consumidor. La definición de la Unión Europea es prácticamente la misma a la establecida por el Comité de Residuos de Drogas Veterinarias en Alimentos del Codex Alimentarius. Aunque en los Estados Unidos no existe una regulación formal establecida para el LMR su equivalente es el término tolerancia establecido por las autoridades regulatorias competentes (FAO/OIE/WHO, 2003).

En América del Sur, el MERCOSUR (2000) decidió aprobar el Reglamento Técnico de Metodologías Analíticas, Ingesta Diaria Admisible y Límites Máximos de Residuos para Medicamentos Veterinarios en Alimentos de Origen Animal para ser aplicado en los países miembros (Paraguay, Uruguay, Argentina y Brasil) con fines de comercio e importaciones.

El Reino Unido posee un sistema riguroso de vigilancia reglamentaria y no reglamentaria para la detección de residuos veterinarios. El Programa Nacional de Vigilancia, cumple con las obligaciones impuestas por la Comunidad Europea mediante las Directivas de Consejo 96/22/EC y 96/23/EC (Bishop, 2004). La autoridad competente que implementa estos requerimientos es la Directiva de Medicina Veterinaria (VMD). Cuando los residuos de sustancias autorizadas se encuentran por encima del Limite de Residuo Máximo (LMR), un Oficial Veterinario del Servicio Veterinario del Estado (SVS) lleva a cabo una investigación en la granja de origen para establecer la fuente del residuo.

Si se determina la presencia de sustancias prohibidas o si se detectan concentraciones de residuos sumamente altos de sustancia autorizadas, un Oficial de Investigación del área legal del Departamento del Medio Ambiente, Alimentos y Asuntos Rurales (DEFRA) llevará a cabo la investigación (VRC, 2005). Los análisis son llevados a cabo por el Laboratorio Químico del Gobierno y los resultados son publicados por el VMD trimestralmente y anualmente por el Comité de Residuos Veterinarios (VRC). Estos resultados son presentados para el escrutinio en reuniones del VRC durante el año. Todos los resultados son vistos por la Agencia de Alimentos (Food Standard Agency), la cual puede dar una opinión científica sobre la implicancia en la salud humana.

El Servicio Veterinario de Estado toma las acciones a seguir por cada una de las muestras que hayan resultado positivas luego de realizarse análisis confirmatorios sobre la presencia de sustancia no autorizadas o concentraciones de sustancia autorizadas que estén por encima del LRM. Una investigación exhaustiva es realizada en la granja, siendo el granjero aconsejado acerca de cómo evitar que los residuos de antimicrobianos entren en la cadena alimenticia. Si la inspección de los registros de la granja y el stock además de la toma de más muestras, revela una clara evidencia de abuso, el granjero es llevado a juicio (NOAH, 2005).

En España, las regulaciones que protegen la salud pública en asuntos de seguridad alimentaria, siguen las mismas Directivas de Consejo

mencionadas anteriormente y que se encuentran transpuestas en el Real Decreto 1749/1998. El uso y administración de sustancias prohibidas y la presencia de residuos ilegales en alimentos de origen animal está tipificada en los artículos 364 y 264 del Código Penal. Estos artículos hacen referencia a la adulteración de alimentos con productos no autorizados, administración de sustancias no autorizadas en animales de abasto, así como el respeto de los Límites de Residuos Máximos y los períodos de retiro (Díaz y Anadón, 2000).

En los Estados Unidos de Norteamérica, se desarrolló un programa sobre residuos ilegales en carne, aves, mariscos y otros alimentos derivados de animales. Este programa esta a cargo del Servicio de Inspección y Seguridad Alimentaria (FSIS) del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), el cual reporta los casos de violaciones de residuos a la FDA (Food and Drug Administration) para su investigación.

Cuando los animales tratados permanecen en las instalaciones, se debe iniciar acciones para prevenir un mayor procesamiento de los animales. Estas acciones pueden ser: pedir al USDA/FSIS que tome muestras y mantenga detenidos los futuros embarques hecho por el productor y/o pedir al estado la detención o cuarentena de los animales (FDA, 2005).

Cuando se ha confirmado un caso inicial de violación de los residuos de antimicrobianos, la FSIS envía una carta de Notificación de Violación al responsable. Esta carta de notificación se realiza en los siguientes casos:

- Cuando se ha usado drogas consideradas de alto riesgo para la salud o seguridad humana, ya sean drogas aprobadas o no aprobadas.
- Cuando existen los supuestos de uso fuera de las indicaciones previstas (extra-label use). 21 CFR Parte 530.
- Cuando ocurran niveles tan altos de residuos que indiquen un mal uso de manera intencional.
- Cuando se utilicen drogas en las que no se han establecido límites de tolerancia.

En el caso de que las violaciones en los límites de residuos sean repetidos, se envían ya sea una carta de advertencia, se emite un mandato o se abre un proceso judicial dependiendo del tipo de infracción y de los niveles de residuos encontrados.

En México la Norma Oficial Mexicana NOM-004-ZOO-1994 emitida por la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, regula el control de residuos tóxicos en carnes, grasas, hígado y riñón de bovinos, equinos, porcinos y ovinos. La normativa oficial que establece el método de prueba para la determinación de antimicrobianos en hígado, músculo y riñón de bovinos, equinos, porcinos, aves, caprinos y cérvidos es NOM-032-ZOO-1996, la cual fue implementada para asegurarse que el suministro de alimentos no rebase los límites máximos permisibles.

En nuestro país la normativa sobre los residuos veterinarios en alimentos de consumo humano está tipificada en el Reglamento Tecnológico de Carnes (D.S. N° 22-95-AG), el cual en el Título III, artículo 19, establece que, está prohibido beneficiar con fines de comercialización todo animal que se encuentre en tratamiento hasta que los residuos hayan sido eliminados o metabolizados.

En lo que respecta a Leche, no existe ninguna normativa vigente, el INDECOPI establece criterios y requisitos de leche cruda, sin embargo, la Norma Técnica peruana, no tiene ninguna especificación exacta sobre la presencia de residuos de antibióticos en leche cruda, el único requisito en el que podría estar involucrado este aspecto se encuentra en la frase “la leche debe estar exenta de sustancias extrañas”, en contraparte este punto si es contemplado y especificado en otras normas internacionales, como el Codex Alimentarius (INDECOPI, 2003).

Al respecto, el Codex Alimentarius, el cual rige a nivel internacional, en su norma CAC/RCP 57–2004 “CÓDIGO DE PRÁCTICAS DE HIGIENE PARA LA LECHE Y LOS PRODUCTOS LÁCTEOS” especifica lo siguiente: “La leche cruda debe provenir de animales tratados solamente con medicamentos veterinarios autorizados por la autoridad competente con arreglo a su uso específico y de una manera que no tenga efectos negativos en la inocuidad e

idoneidad de la leche, lo que incluye el respeto del período de suspensión prescrito. *En caso de animales lecheros tratados con medicamentos veterinarios que puedan pasar a la leche, ésta deberá ser debidamente desechada en tanto no haya transcurrido el período de suspensión prescrito para el medicamento en cuestión.* Los residuos de medicamentos veterinarios presentes en la leche no deben superar niveles que entrañen un riesgo inaceptable para el consumidor. *Se ha constatado que un uso inadecuado de medicamentos veterinarios puede dar lugar a la presencia de residuos potencialmente nocivos en la leche y los productos lácteos, y afectar a la idoneidad de la leche destinada a la fabricación de productos fermentados.*

Se está promoviendo el uso continuo del antibiótico virginiamicina en vacas lecheras, con licencia del SENASA para la profilaxis de la acidosis ruminal subclínica, uso no autorizado en su país de origen (Andresen, 2000)

2.8 Métodos de detección de residuos de antibióticos

En la valoración de residuos de antibióticos en los alimentos se emplean preferentemente métodos microbiológicos, cuyo fundamento es la sensibilidad de ciertos microorganismos para los diversos antibióticos aplicados a distintas técnicas, que se basan en la respuesta, positiva, negativa o graduada. Estos métodos pueden demandar unos minutos, horas o hasta una noche entera de inoculación, en el caso de los más comunes; también los hay por dilución en medio sólido o medio líquido, usando diferentes métodos para determinar el efecto. Existen también análisis donde se utilizan kits, basados en técnicas inmucromatográficas, para realizar determinaciones rápidas de presencia o no de antibióticos principalmente en alimentos como leche y carnes (Cravzov *et al*, 2002).

La mayoría de los métodos de análisis reportados en la actualidad y adoptados por la Comisión del CODEX Alimentarius sobre Residuos de medicamentos Veterinarios en alimentos están basados en la utilización de técnicas cromatográficas como HPLC(Cromatografía líquida de alto performance) y CG (Cromatografía de gases) (Noa, s/f).

La elección del tipo de método a utilizar depende de numerosos factores, en forma general, los métodos basados en técnicas cromatográficas, que son en la actualidad los más usados requieren de pasos de purificación más exhaustivos, debido a que se precisa de una mayor pureza de los extractos para la aplicación a un equipo cromatográfico (Taburet, 1998).

Dentro de la Unión Europea, la prueba recomendada para analizar muestras de leche es un método que utiliza *Bacillus stearothermophilus*. Este método es especialmente sensible a penicilinas siendo el límite de detección de 2(-4) ppb para la benzilpenicilina, ampicilina y amoxicilina; y, de 15(-35) ppb para oxacilina y cloxacilina (EMEA, s/f)

En los Estados Unidos, en una publicación del programa de la Pacific Northwest Extensión (Gangwer *et al.*, 1994) se menciona que las pruebas comerciales mayormente usadas en la detección de residuos de fármacos betalactámicos en los tanques contenedores de leche en granja han sido:

- Delvotest-P: Contiene *Bacillus Stearothermophilus* en medio sólido, es extremadamente sensible a los beta-lactámicos especialmente penicilinas. Sin embargo, el tiempo que tarda esta prueba (2,5 horas) puede ser visto como una desventaja por los granjeros.
- SNAP Betalactámico: El cual contiene una tableta reactiva que indica la presencia de antimicrobianos en la leche. La ventaja que posee esta prueba radica en el corto tiempo empleado siendo éste 10 minutos en total.
- Lac Tek: Utiliza ELISA para la detección de betalactámicos siendo ésta una de las ventajas debido a su exactitud. Además, sólo requiere cinco minutos por muestra para su realización.
- Penzyme: Utiliza viales de vidrios con enzimas y tabletas reactoras. Esta prueba dura sólo 20 minutos.
- Charm: Es una prueba que usa tubos de pruebas, y tabletas microbiales para su realización. La duración en total es de tres horas ya que este es el tiempo mínimo necesario para que se dé crecimiento o inhibición bacteriana.

El FDA (Food and Drug Administration), en los Estados Unidos, desarrolló un programa de validación para pruebas rápidas comerciales que pudieran ser usadas en la detección de antimicrobianos en leche y que siguieran regulaciones establecidas. Para que un kit de prueba sea considerado de uso regulatorio, éste debe ser capaz de detectar cuatro de los seis antimicrobianos betalactámico comúnmente usados en producción láctea en ese país. Las seis drogas betalactámico son ampicilina, amoxicilina, ceftiofur, cefapirina, cloxacilina y penicilina G (Kijak, 2004).

En Francia, se utiliza una técnica de detección de residuos añadiendo a las leches sospechosas verde ácido BS o azul FcF, desarrollándose color sólo en las muestras positivas que contienen penicilina a más de 0.003 UI / litro, la diferencia entre los resultados obtenidos por diferentes autores se debe a que estos resultados dependen de numerosos factores (época del año, estado de la muestra, método de detección) (Veisseyre, 1980).

La prueba Charm ha sido un método ampliamente aceptado para la detección de residuos de antimicrobianos en leche. Esta prueba ha sido reconocida por la Asociación Internacional de Comunidades Analíticas (AOAC). La prueba Charm está basada en el enfrentamiento de penicilina radioactiva (y posteriormente tetraciclinas, eritromicina, streptomycin, novobiocina, sulfametazina, y cloranfenicol) con células vegetativas de *Bacillus stearothermophilus*. Existen al menos 7 versiones diferentes de ésta prueba, tres de las cuales han sido simplificadas para su uso en granja (Harth y Steele, 2001). Una de las últimas versiones de esta prueba es la prueba Charm SL-6 la cual fue aprobada por la FDA en el 2003. Esta prueba además de detectar los betalactámicos requeridos por ley también detecta (en granja) cloxacilina (Douglas *et al.*, 2003).

Un test de cultivo en yogurt para la detección en forma rutinaria de antimicrobianos y otros residuos en leche fresca fue desarrollado por Yamani *et al.* (1999). La finalidad de este estudio fue examinar el empleo de un test simple y de crecimiento estandarizado que permita analizar el suministro de leche en el mismo tiempo que las pruebas actuales y, comparar el desempeño de la prueba con el método Delvotest-P de aceptación internacional. La prueba

se hizo acidificando las muestras de leche obtenida a un pH 6,0; añadiendo Rojo Clorofenol como indicador; e inoculando la leche con un cultivo conteniendo una mezcla balanceada de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* sub-especie *bulgaricus*. Una vez realizada la mezcla, se incubaron las muestras a 42° C. En ausencia de sustancias inhibitorias, luego de 2,5 horas se produjo suficiente cantidad de ácido como para que la leche cuajara y el indicador cambiase de color. Sin embargo, a niveles bajos de antimicrobianos se incrementó el tiempo a 4,0 horas. Todas las muestras que fallaron en formar coágulos a las 2,5 y 4,0 horas fueron analizadas a su vez con la prueba Delvotest-P. Los resultados de la incubación a las 4,0 horas fueron útiles para el desarrollo del siguiente protocolo:

- Falla en el cambio de color del indicador a las 2,5 y 4,0 horas: Niveles inaceptables de antimicrobianos.
- Falla a las 2,5 horas pero cambio de color a las 4,0 horas: Niveles marginales de sustancias inhibitorias.
- Cambio a las 2,5 horas: Sustancias inhibitorias por debajo de niveles detectables.

Esta prueba de yogurt no sería adecuada para el uso dentro de programas de vigilancia cuando la prioridad es proteger al consumidor de niveles extremadamente bajos de residuos betalactámicos; sin embargo, el uso de esta prueba puede darse en países en los cuales el análisis de leche con el fin de detectar antimicrobianos no es obligatorio.

Bogialli *et al.* (2005), presentaron un procedimiento para determinar nueve tipos de antimicrobianos de aminoglucósidos en leche entera de bovinos. Los antimicrobianos estudiados fueron: espectinomicina, dihidroestreptomicina, estreptomicina, apramicina, gentamicina C1, gentamicina C1a, gentamicina C2, gentamicina C2a y neomicina B. Este procedimiento consistió de una fase de dispersión hecha con agua caliente (70° C), la cual fue seguida por cromatografía líquida (CL)-espectrometría de masa en tándem (EM). Cuando la cromatografía líquida es usada en conjunto con la espectrometría de masa, la unión de ambas se convierte en la técnica más

poderosa para detectar residuos de antimicrobianos en los alimentos. El objetivo de este trabajo fue desarrollar un método confirmatorio que pudiera determinar los aminoglucósidos en leche fresca de bovinos, de acuerdo con los niveles determinados que han sido impuestos por la Unión Europea y la FDA.

HPLC (Cromatografía Líquida de alta performance)

El HPLC es un método aprobado por la AOAC, este método, relativamente rápido y simple fue desarrollado para la detección de sulfametacina en leche cruda de ganado vacuno, dentro de un rango de partes por billón (ppb). La sulfametacina es extraída de la leche usando un embudo de separación y cloroformo. El cloroformo se evapora y el residuo graso es disuelto con hexano. La sulfametacina es repartida en una solución de fosfato de potasio la cual es inyectada directamente en el cromatógrafo. Este método puede detectar 10 tipos de sulfonamidas simultáneamente en niveles de 10 ppb (Weber y Smedly, 1998).

Jevinova *et al.* (2003), realizaron un estudio en el cual compararon la sensibilidad del método de difusión en agar (utilizando *Bacillus stearothermophilus*), el método de las cuatro placas y el método de HPLC, para determinar residuos de oxitetraciclina en leche. El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia de residuos de antimicrobianos en leche proveniente de vacas que presentaban signos clínicos de mastitis y que fueron tratadas con oxitetraciclina. Las muestras de leche fueron analizadas para la presencia de éste fármaco durante todo el período de tratamiento intramamario (5 días), así como también durante cuatro días después de terminado el tratamiento.

Para poder comparar la sensibilidad de los tres métodos, éstos fueron empleados simultáneamente. Se utilizaron 6 vacas con signos clínicos confirmados por la Universidad de Medicina Veterinaria en Kosice las que fueron tratadas con oxitetraciclina intramamaria con un intervalo de 24 horas. Las muestras de leche fueron recolectadas inmediatamente antes del primer tratamiento (0 horas), y luego después de las 24, 48, 72, 96, 120 144, 168 y

192 horas (siendo el período de retiro de 5 días). Los resultados obtenidos fueron:

De los resultados obtenido, *B. subtilis* a pH 6,0 mostró la mayor sensibilidad y *M. luteus* mostró la menor sensibilidad para determinar la presencia de residuos de oxitetraciclina en leche. El *B. stearothermophilus* no es suficientemente sensible para determinar los residuos de esta droga en leche. Muestras que contenían residuos que sobrepasaban los límites máximos, confirmadas mediante HPLC, no fueron detectadas en todos los casos cuando se utilizó el test de difusión en agar con *B. stearothermophilus*.

ENSAYOS INMUNOENZIMATICOS (SNAP)

Prueba para detección de residuos de antibióticos en leche bovina cruda, en niveles iguales o inferiores a los niveles de tolerancia y en menos de 10 minutos. Constituye una prueba rápida, exacta y ofrece resultados valiosos en establos ganaderos, tanques de almacenamiento y plantas procesadoras de productos lácteos. Permite detectar Betalactámicos, Aflatoxinas, Tetraciclinas o Gentamicinas. Ofrece resultados en menos de 9 minutos. Fácil de usar y de interpretar. Solo requiere 3 pasos. Puede ser usado en el establo o en la planta. Solo requiere un pequeño calentador. No tiene interferencia por altos recuentos de células somáticas, cuentas bacterianas elevadas o residuos de yodo, lo que lo hace ser el más competitivo y versátil del mercado. Aprobado por AOAC (the scientific association dedicated to analytical excellence). (IDEXX, 2004).

En Corea, Lee *et al.*, (2001) realizaron un estudio en el cual establecieron una prueba de detección rápida de residuos ilegales penicilinas (ampicilina y amoxicilina) que permitió predecir los niveles residuales en tejidos a partir de muestras de sangre. La técnica utilizada fue ELISA y las muestras se obtuvieron durante el periodo de retiro de las drogas. En este experimento se tomaron muestras de 10 vacas lecheras a las que se les inyectó ampicilina de forma intramuscular durante 7 días; así mismo se les inyectó amoxicilina dos veces con un intervalo de 24 horas. Se tomaron muestras de sangre antes

de la administración de las drogas y en los días 1, 3, 5, 6, y 10 luego de la última inyección de ampicilina y, en los días 1, 3, 7, 10 y 14 luego de la última inyección de amoxicilina. Las muestras fueron depositadas en tubos heparinizados y centrifugadas para la obtención del plasma. El protocolo de la prueba de ELISA para la detección de betalactámicos en leche fue adaptada para su uso con plasma. Los resultados fueron:

- Ampicilina. En el día 1, 8 de 10 muestras resultaron positivas. El número de muestras positivas en el día 3 fue de 5. Todas las muestras resultaron negativas luego del día 5 del período de retiro.
- Amoxicilina. Todas las muestras resultaron positivas en el día 1. En el día 3, 4 de 10 muestras resultaron positivas. Luego del día 5, todas las muestras resultaron negativas.

Los autores afirman que es posible que los inspectores de los canales puedan utilizar este método para la detección de penicilinas en plasma de animales que estén en corrales de espera antes de ser beneficiados. Los resultados se obtendrían en el mismo día y los animales que dieran positivos serían separados hasta que pruebas posteriores resulten negativas.

III. MATERIALES Y METODOS

3.1 Lugar de estudio

El estudio se realizó en el departamento de Lima, en 7 establos de la cuenca lechera de Lima, con un consentimiento firmado de mantener en el anonimato la identidad de los hatos muestreados. En todos los establos muestreados el ordeño fue de tipo mecánico y con una frecuencia de dos ordeños por día, las vacas eran alimentadas con concentrado y chala, y medicaban a los animales con Mastitis con antibióticos betalactámicos. Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria, Unidad de Bacteriología y Micología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

3.2 Tamaño de muestra

El número de animales a muestrear se determinó con la fórmula de cuantificación de una enfermedad (prevalencia límite) siendo el tamaño muestral de 59 animales; considerando una prevalencia límite esperada (p) igual al 5% y una significancia del 5%.

$$N = \frac{\text{Ln } \alpha}{\text{Ln } (1-p)}$$

Donde:

α = Nivel de significancia (0.05)

p = Prevalencia limite esperada (0.05)

3.3 Muestras

Se tomaron muestras de leche de vacas tratadas contra Mastitis Clínica con antibióticos betalactámicos, las cuales se tomaron en el primer ordeño después del periodo de retiro del tratamiento usual en cada establo (3 días).

El estudio contempló la utilización de muestras controles (una por establo muestreado) que corresponden a leche de vacas que no recibieron tratamiento antibacteriano alguno en al menos un mes previo al estudio.

3.4 Recolección de muestras

Se tomaron 10 CC. de leche, los cuales fueron depositados en tubos de plástico graduados con tapa rosca previamente esterilizados y debidamente identificados, indicando: procedencia, antibiótico utilizado en el tratamiento, tiempo de retiro, nivel de producción lechera y vía de administración utilizado. Las muestras fueron transportadas inmediatamente después de ser colectadas y se refrigeraron a una temperatura entre 0 - 10° C hasta su traslado al laboratorio.

3.5 Materiales y equipos utilizados en el laboratorio

- Calentador SNAP
- Refrigerador
- Dispositivos SNAP BetaLactam®
- Pipetas plásticas

- Tubos de prueba
- Tubos de plástico graduados tapa rosca
- Cooler
- Refrigerante
- Rejillas
- Sellador de pezones

3.6 Procesamiento de las muestras

Las muestras de leche se analizaron mediante el SNAP Betalactam® el mismo día que fueron recolectadas. Este test es un ensayo inmunoenzimático en fase sólida que determina la presencia de residuos de sustancias antibióticas de la familia de los Betalactámicos. Posee un grado de sensibilidad y especificidad del 99% en el diagnóstico de residuos de antibióticos betalactámicos en leche para los antibióticos establecidos, ya que, los niveles mínimos que detecta el test, coinciden con los límites máximos de residuos que deben encontrarse en leche según normas europeas.

Cuadro Nº 7: Nivel de detección de LMR (ppb) de residuos de antibióticos Betalactámicos del SNAP Betalactam®

TIPO DE DROGA	LMR (ppb)*	NIVEL DE DETECCION SNAP LMR (ppb)
Cefalonium	10	3 – 5
Cefalexina	100	20- 25
Nafcilina	30	70
Dicloxacilina	30	20 – 25
Cefazolina	50	15 – 20
Cefquinona	20	20
Cefacetril	125	50
Amoxicilina	4	7 – 8
Ampicilina	4	4 – 6
Ceftiofur	100	5 – 7
Cefapirina	60	10 – 12
Cloxacilina	30	30 – 40
Penicilina	4	2 - 3
Oxacilina	30	40 – 60
Cefoperazona	50	10 - 15

* Según Norma Europea de LMR de antibióticos Betalactámicos en leche.

3.6.1 Fundamento del análisis

El SNAP Betalactam, es un ensayo inmunoenzimático competitivo en fase sólida. El análisis se basa en la inhibición de la unión de la enzima ligada a su receptor específico en fase sólida por acción de los antibióticos presentes en la muestra.

Esencialmente, los antibióticos Betalactámicos son capturados por los anticuerpos inmovilizados si están presentes, entonces el antibiótico en la muestra compite con un antibiótico estándar interno para unirse al receptor específico. El complejo anticuerpo-antibiótico formado se liga generalmente a una enzima que cataliza la aparición de color. Esta prueba contiene además un complejo inmune de control que es diluido por la solución muestra. El conjugado control migra a través de la membrana a la zona control donde forma una zona coloreada. A pesar de la presencia o ausencia de la sustancia buscada la línea de control se formara en la zona control para asegurar que el análisis esta trabajando adecuadamente. Una comparación de la intensidad de la reacción de la “prueba” con el de un “control” determina si la muestra es positiva o negativa. Debido a su principio competitivo, una intensidad reducida significa generalmente un resultado “positivo” mientras que una intensidad alta se lee como “negativo” (Neaves, 1999).

3.6.2 Procedimiento del análisis

1. Se verificó que el SNAP tenga presentes las manchas en el punto de activación y zona de resultados, y que el pellet coloreado del tubo se deslice libremente.
2. Se encendió el calentador SNAP 15 minutos antes de la prueba, y se colocó la unidad SNAP sobre el calentador.
3. Con la pipeta se tomaron 450 ul de la muestra de leche y se agregó al tubo de prueba.
4. Se agitó el tubo hasta que el reactivo (pellet) se disolvió completamente.
5. Se incubó la muestra y el dispositivo SNAP durante 5 minutos a una temperatura de 45 °C.

6. Se adicionó la muestra del tubo incubado en la celda de muestra del dispositivo SNAP, luego que esta alcanzo el circulo de activación y el color empezó a desaparecer se presiono con fuerza el activador (SNAP)
7. Se incubó por un período de 4 minutos en el calentador SNAP a 45° C.
8. Se procedió a leer el resultado.

3.6.3 Interpretación de resultados

Para determinar si una muestra es positiva o negativa se tuvo en cuenta los siguientes criterios:

- Se consideró una **muestra negativa** cuando el color del punto de muestra fue más oscuro o igual que el color del punto control.
- Se consideró una **muestra positiva** cuando el color del punto de muestra fue mas claro que el color del punto control.

3.7 Análisis de datos

Los datos se analizaron teniendo en cuenta el criterio de prevalencia limite, donde al menos una muestra positiva nos aseguró que la prevalencia de leches con residuos de antibióticos betalactámicos después del período de retiro post tratamiento contra mastitis se encuentra en el nivel de al menos la prevalencia limite considerada en el estudio (5%).

Además, se determinó la frecuencia de muestras positivas totales para el estudio, de acuerdo a las variables:

- Tipo de Antibiótico betalactámico utilizado en el tratamiento.
- Vía de administración del antibiótico: intramamaria o intramuscular.
- Nivel de Producción de la vaca muestreada: alta, media o baja.

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa estadístico SPS. Para determinar si había asociación entre cada una de las variables de estudio con la presencia de residuos de antibióticos en la muestra, se utilizo la prueba de Chi cuadrado con un nivel de significancia del 5% ($p > 0.05$).

IV. RESULTADOS

El objetivo del presente estudio fue evidenciar la presencia de residuos de antibióticos en leche detectables a una prueba inmunoenzimática, en vacas que han finalizado su periodo de tratamiento contra mastitis y reingresan a la producción.

El análisis de los resultados del estudio indica que el 45% (27/60) de las muestras resultaron positivas a la prueba de Betalactámicos (Tabla N° 1), es decir, presentaban residuos de antibióticos después de 3 días (periodo de retiro) de terminado el tratamiento contra mastitis, momento en el que la leche regresa al tanque de producción y es destinada al consumo humano o a la preparación de subproductos.

Tabla N° 1: Porcentaje de animales positivos al Test de Betalactámicos.

	Nº	%
POSITIVO	27	45
NEGATIVO	33	55
TOTAL	60	100

En relación al tipo de betalactámico utilizado en el tratamiento, las muestras analizadas presentaron porcentajes de positividad a la presencia de residuos de antibióticos Betalactámicos de 56% (14/25) para los animales tratados con una asociación de Penicilina y Estreptomicina, 26.67% (4/15) para los tratados con la asociación de Kanamicina y Penicilina y 45% (9/20) para los tratados con la asociación de Amoxicilina y Ácido Clavulónico (Tabla N° 2).

Tabla N° 2: Porcentaje de animales positivos al Test de Betalactámicos, según antibiótico utilizado en el tratamiento

	PEN-STR		KAN + PEN		AMX + CLAV		TOTAL MUESTRAS
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	
POSITIVO	14	56	4	26,67	9	45	27
NEGATIVO	11	44	11	73,33	11	55	33
TOTAL	25	100	15	100	20	100	60

El porcentaje de positivos al Test de Betalactámicos, de acuerdo a la vía de administración utilizada para el tratamiento, fue de 50% (14/28) para los animales a los que se le aplicó el tratamiento por vía intramuscular y 40.63% (13/32) para los tratados por vía intramamaria (Tabla N° 3).

Tabla N° 3: Porcentaje de animales positivos al Test de Betalactámicos, según la vía de administración utilizada.

	INTRAMUSCULAR		INTRAMAMARIO	
	Nº	%	Nº	%
POSITIVO	14	50	13	40,63
NEGATIVO	14	50	19	59,37
TOTAL	28	100	32	100

De acuerdo al nivel de producción de los animales muestreados encontramos que el 46.67%(7/15), 57.14% (12/21) y 33.33% (8/24) de las vacas de baja, media y alta producción, respectivamente, seguían presentando residuos de antibióticos en leche después de 3 días de terminado su tratamiento (Tabla N° 4).

Tabla N° 4: Porcentaje de animales positivos al Test de Betalactámicos, de acuerdo al nivel de producción.

	BAJA		MEDIA		ALTA	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
POSITIVOS	7	46,67	12	57,14	8	33,33
NEGATIVOS	8	53,33	9	42,86	16	66,67
TOTAL	15	100	21	100	24	100

No se observó asociación entre la presencia de residuos en la leche por efecto de las variables tipo de antibiótico utilizado, vía de administración y nivel de producción.

Tabla N° 5: Resultados de la prueba de Chi cuadrado para cada una de las variables evaluadas.

VARIABLE EVALUADA	RESULTADO CHI CUADRADO		
	Valor	gl	Sig Asintót (2 sided)
Tipo Antibiótico utilizado	4.835 ^a	2	0.089
Vía de Administración	0.530 ^b	1	0.466
Nivel de Producción	2.588 ^c	2	0.274
Numero de Casos Válidos	60		

- 0 casillas (,0%) tienen frecuencias esperadas menores que 5. La frecuencia de casilla mínima espera es 6.30.
- 0 casillas (,0%) tienen frecuencias esperadas menores que 5. La frecuencia de casilla mínima espera es 12.60.
- 0 casillas (,0%) tienen frecuencias esperadas menores que 5. La frecuencia de casilla mínima espera es 6.75.

V. DISCUSIÓN

El tratamiento contra Mastitis clínica en nuestro medio consta de la aplicación de antibióticos por vía intramuscular o vía intramamaria en la mayoría de los casos; luego de finalizado el tratamiento con antibióticos, las vacas pasan un periodo, el cual varía de acuerdo al tipo de antibiótico utilizado, donde los animales siguen siendo ordeñados pero la leche obtenida es eliminada hasta terminado dicho periodo, momento en el cual las vacas regresan a producción. Estos antibióticos generan residuos en el organismo de las vacas y en sus secreciones, pudiendo provocar problemas en salud pública debido a que existen personas alérgicas a diversos grupos de antibióticos, en las cuales podría producir diversas reacciones. Además, el consumo de leche o productos con residuos de antibióticos puede producir el aumento de microorganismos resistentes a dichos antibióticos en el cuerpo humano; y en el caso de productores de derivados de la leche como quesos y yogurt estos residuos van a producir interferencia en el crecimiento de los cultivos iniciadores de sus productos.

Los resultados del estudio, indican que existe un alto porcentaje de animales (45%) que siguen presentando residuos de antibióticos en leche luego de finalizado el periodo de retiro, y que según el test estos niveles encontrados superan los límites máximos permisibles de residuos de antibióticos Betalactámicos en leche, según las normas europeas. Esto significa que leche con residuos de antibióticos ingresa al tanque de producción

de cada uno de los establos evaluados y que por tanto se está destinando al consumo humano leche contaminada con estos residuos. Además, se ha podido notar que dichos establos no realizan monitoreos para controlar la presencia de residuos en la leche de los animales que reingresan a la producción.

Los datos encontrados sobrepasan ampliamente los resultados encontrados en otro estudio realizado en el departamento de Cajamarca, donde el porcentaje de muestras con presencia de residuos de antibióticos alcanzó solo el 20% (Llanos, 2002). Esta diferencia en los porcentajes de positividad encontrados puede deberse a que las muestras de leche analizadas en el estudio de Cajamarca provenían de mercados, tiendas y fundos, lo que pudo de alguna manera disminuir la probabilidad de que por cada litro de leche se encuentre una cantidad de residuos suficiente para ser detectado por la prueba; mientras que, las muestras que nosotros analizamos fueron directamente tomadas de los animales tratados, aumentándose así la probabilidad de encontrar residuos de antibióticos, debido a la mayor concentración de residuos de estos en una muestra directa.

Otro punto a tener en cuenta es el método de detección de residuos de antibióticos utilizado; nosotros utilizamos una prueba inmunoenzimática que mide con mayor precisión la presencia o ausencia de residuos de antibióticos en la leche, mientras que en el estudio realizado en Cajamarca las muestras fueron analizadas mediante pruebas microbiológicas en placa, que son menos sensibles para detectar dichos residuos. Sin embargo, debemos tener en cuenta, que el aumento en el porcentaje de residuos de antibióticos en leche, puede deberse también al actual uso indiscriminado que se está haciendo de los mismos, pudiendo generar así resistencias bacterianas en los animales, por lo tanto, el animal demora en curarse, prolongando el tratamiento, repercutiendo esto en la aparición de una mayor cantidad de residuos de antibióticos en la leche.

Por otra parte, son muy pocos los productores que conocen este tipo de problemas y no respetan adecuadamente los tiempos de retiro indicados en las etiquetas de acuerdo al tipo de antibiótico utilizado; ó tal vez los tiempos

recomendados sean insuficientes para eliminar la probabilidad de encontrar residuos de antibióticos en la leche. Por ejemplo, en México, Ocampo y Rodríguez (2001) determinaron mediante un ensayo inmunoenzimático (SNAP Betalactam), que la persistencia de residuos de antibióticos se prolonga hasta 6 días después de terminado el tratamiento, difiriendo de lo utilizado comúnmente en la práctica clínica.

En relación al tipo de betalactámico utilizado en el tratamiento, la asociación entre Penicilina y Estreptomina produjo el más alto porcentaje (56%) de animales positivos a la prueba. Pudiendo sugerir, que el uso de la asociación entre Penicilina y Estreptomina, probablemente necesite un mayor tiempo de retiro para evitar la presencia de residuos de este antibiótico en la leche; o que probablemente las dosis utilizadas para el tratamiento podrían haber sido más altas, por lo tanto, esto influyó en una mayor concentración de antibiótico que deje residuos.

Hubo una mayor cantidad de animales que presentaron residuos de antibióticos en leche cuando se trataron por vía intramuscular (50%) a diferencia de los tratados por vía intramamaria. Esto podría indicar, que hay una tendencia en las vacas tratadas por vía intramuscular a tener un mayor tiempo de permanencia del antibiótico en el organismo del animal; ya que, al administrar intramuscularmente un antibiótico, este se difunde por el organismo llegando a la ubre del animal por vía sistémica, requiriendo un mayor tiempo para que los residuos del antibiótico sean eliminados totalmente, mientras que, la aplicación intramamaria es solo en el sitio de la infección; además el ordeño podría influir favoreciendo la eliminación de residuos de antibióticos en los animales tratados por vía intramamaria, debido a efectos mecánicos. Sin embargo, se necesitarían más estudios que corroboren esta hipótesis.

El mayor porcentaje de leche de vacas que presentan residuos de antibióticos fue el de las vacas de producción media (57.14%). Según algunos autores el nivel de producción influye en la presentación de mastitis; ya que, la mayor cantidad de animales que presentan mastitis son los animales de alta y media producción, debido al manejo que es sometido el animal durante el ordeño y a las condiciones propias de las ubres de las vacas de alta producción

(Gröhn *et al.* (1990); Solbu, 1983). Aunque otros autores como Uribe, 1998; Dohoo y Martin (1984), Erb *et al.* (1985) y Bigras-Poulin *et al.* (1990), no encontraron diferencias estadísticas significativas en la presentación de mastitis clínica y nivel de producción de la vaca.

Existen factores propios del manejo de cada establo, como los tiempos de retiro, las dosis utilizadas, el monitoreo de los animales tratados, el nivel de producción de los animales o el antibiótico suministrado que también podrían influir en la presencia de residuos de antibióticos en la leche.

La presencia de residuos de antibióticos en alimentos destinados a consumo humano directo, como la leche, debería ser regulada por las autoridades correspondientes, para evitar la aparición de problemas de salud en las personas y evitar el aumento de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos. Debe tomarse mucha atención a los resultados encontrados, ya que la existencia de estos residuos indica que se estarían superando los LMR según las normas europeas, ya que, el test utilizado en este estudio da una muestra como positiva (presenta residuos de antibióticos) cuando los residuos existentes alcanzan la cantidad mínima para sensibilizar el test, la cual esta acorde con el LMR establecido por normas internacionales.

VI. CONCLUSIONES

1. La prevalencia límite en vacas que presentan residuos de antibióticos Betalactámicos en leche, después de 3 días de periodo de retiro, es mayor al 5%.
2. El 45% de las vacas tratadas contra mastitis con antibióticos betalactámicos después del tercer día del periodo de retiro, siguen presentando residuos de antibióticos en leche.
3. Se necesitan otros estudios para determinar si existe asociación entre la presencia de residuos de antibióticos en leche y otros factores como: nivel de producción, la vía de administración, procedencia de la muestra, nivel tecnológico del establo y tipo de antibiótico empleado.

VII. RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios utilizando métodos cuantitativos para determinar la cantidad exacta de residuos de antibióticos en muestras de leche provenientes de animales tratados con antibióticos, y así determinar si estos sobrepasan los límites máximos permisibles de residuos (LMR) establecidos en el Codex Alimentarius.
2. Establecer un programa de control, y una Norma Técnica que establezcan los límites máximos permisibles de residuos de antibióticos en alimentos destinados al consumo humano directo, como la leche y sus subproductos.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- Acebo V. M. 2004. Mastitis: afecta la producción y la calidad de la leche. Intervet, Ecuador. En línea: http://intervet.com.ec/binaries163_74032.doc. Jueves 20 de abril del 2006.
- Allison, J R.D. 1998. Antibiotic Residues In milk. *Br. Vet. J.*; 141:9-16.
- Agénjo, C.C. 1956. Enfermedades infecciosas y colectivas de las reses de ordeño. Capítulo VI. Enciclopedia de la Leche. Espasa Calpe: Madrid. Pag. 126 – 131.
- Andresen, S. Hans. 2001. Mastitis: Prevención y control. *Rev. Investig. Vet. Perú.* July. Doc. 12. (2). Pág. 55-64.
- Andresen, H. 2000. Control de calidad en medicina veterinaria. Revista de Ciencias Veterinaria. Lima – Perú. 16 (3) Pag. 3-4.
- Archimbault, P.; Boutier, C; Fellous, R. y Muscat, G. 1980. Influence de la Nature de L Excipient sur L elimination des antibiotiques administratis par coire intramamarie. *Rec. Med. Vet.* 131: 209-222.
- Ariens, E. J. 1964. The mode of action of biologically active compounds. In: Stevens G.D. Ed: *Molecular Pharmacology. New York. Academic Press.* 136-148.

- Bigras-Poulin, M.; Meek, A.H. y Martin, S. W. 1990. Interrelationships among health problems and age on milk production in selected Ontario Holstein cows, *Prev. Vet. Med.* 8: 3-13.
- Bishop, Y. 2004. The Veterinary Formulary. 6^a Ed. Pharmaceutical Press. Londres, UK.
- Booth, J.M. 1982. Antibiotic residues in milk. *In practice* 4:101.
- Booth, N. y McDonald, L. 1988. Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 6th Ed. Iowa State University Press. America.
- Bermudez, P.E.; Ascencios, P.M.; Cordoba, R.J.; Nuñez, B. y Rodríguez, M.J. 2006. Investigación de residuos de antibióticos. Prácticas de higiene, inspección y control alimentario, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, España.
- Cabrera, V. M. P. y Suarez, G. L. F. 2005 Como Obtener Leche de Buena calidad. En línea: <http://www.turipana.org.co/leche.htm>. Jueves 20 de abril del 2006.
- Cornell University. 2002. Importance of Raw Milk Quality on Processed Dairy Products. Dairy Science Facts, Department of Food Science, Universidad de Cornell, USA.
- Craig, W. 1998. Pharmacokinetic-pharmacodynamic parameters: rationale for antibiotic use in mice and men. *Clin. Infect. Dis.* 26:1-12.
- Cravzov, L.A.; Avallone, M.C. y Dupertuis, I. P. 2002. Detección instrumental de Antibióticos en alimentos. Cátedra de química Analítica Instrumental, Dpto de Química Facultad de Agroindustrias-UNNE, Chaco, Argentina.
- Crawford, L. y Franco, D. 1994. Animal Drugs and Human Health. Ed. Technomic, Pennsylvania.
- Díaz, P. y Anadón, A. 2000. Residuos de Sustancias con Actividad Biológica en Alimentos de Origen Animal y Responsabilidad Legal. *EUROCARNE*, año X, N° 83.
- Díez, P. y Calderón, V. 1997. Empleo de antibióticos en veterinaria. *Revista Española de Quimioterapia*, Madrid. 10 (4) Págs.: 1

- Dohoo, I. R. y Martin S. W. 1984. Disease, production and culling in Holstein-Friesian cows. IV. Effects of disease on production, *Prev. Vet. Med.* 2: 755-770.
- Douglas, D.; Makovsky, R.; Ruth, G.; Saul, S. y Salter, R. 2003. The New Charm SL6 (Safe Level) β -Lactam Test Detects All Required β -Lactam Drugs within 30% of Safe Level Tolerances. Charm Sciences, Inc. National Mastitis Council, 42nd Annual Meeting. Estados Unidos. Enero 26-29.
- Drusano, GL. 1988. Role of pharmacokinetics in the outcome of infecciones. *Antimicrob Agents Chemother* 32:289-97.
- Erb, H. N., Smith, R. D.; Oltenacu, P. A.; Guard, C. L.; Hilman, R. B.; Powers, P. A.; Smith, M. C. y White, M. E.. 1985. Path model of reproductive disorders and performance, milk fever, mastitis, milk yield, and culling in Holstein cows, *J. Dairy Sci.* 68: 3337-3349.
- Errecalde, J. 1994. El uso racional de los antimicrobianos en explotaciones lecheras. *Jornadas de Actualización en Lechería*. Lincoln, Buenos Aires, Argentina.
- Errecalde, J. 1996. Antimicrobianos en leche: Su importancia en Salud Pública. *Boehringer Ingelheim S.A.* Buenos Aires, Argentina.
- Errecalde, J. 2000. Uso racional de antibióticos en explotaciones lecheras. *Jornada de Antibióticos en Leche*. Nueva Helvecia. Uruguay. Pp. 73-79.
- Errecalde, J. 2003. La elección del medicamento de calidad. Libro de resúmenes de las XIV Jornadas Ganaderas de Pergamino, Buenos Aires. Argentina. Pp. 72-76.
- Errecalde, J. 2004, Uso de Antimicrobianos en Animales de Consumo Incidencias del Desarrollo de Resistencias en salud Publica, FAO producción y Sanidad Animal, Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación. Roma.
- EMA, s/f. Penicillins, summary report. Agencia Europea para la Evaluación de Productos Medicinales. En línea: <http://www.emea.eu.int/pdfs/vet/mrls/penicillins.pdf>. Miercoles, 19 de Julio de 2006.

- Franclin, A; Hom, A.F.M.; Otenson, K.; Astrom, G. 1986. Concentrations of Penicillin and spiromicyn in Bovine udder tissue liquids. *Am J. Vet.Res;* 47:804-807.
- FAO/OIE/WHO. 2003. First Joint Expert Workshop on Non-Human Antimicrobial usage and antimicrobial resistance: Scientific assessment. Background Document.
- Gröhn, Y.T.; Erb, H.N.; Mcculloch, C.E. y Saloniemi, H.S. 1990. Epidemiology of reproductive disorders in dairy cattle: Associations among host characteristics, disease and production, *Prev. Vet. Med.* 8: 25-39.
- Gutiérrez, R.J.M 1962. Detección de Antibióticos en la leche de consumo de Lima, Callao y Balnearios. Tesis Bach. Fac. Med. Vet. Uni. Nac. May. de San Marcos, Lima-Perú. Págs: 12-13
- Harth, E. y Steele, M. 2001. Applied Dairy Microbiology. 2ª edición. Ed. Marcel Dekker. New York.
- Hays, B.W. 1986. Benefits and risk of antibiotics use in agriculture. En: Mortss. W.A. Agriculture uses of antibiotics American chemical society. Washington DC.
- Honkanen, B.T. y Reybroeck, W. 1997. Antimicrobials, in monograph on residues and contaminants in milk and milk products. IDF. Brussels, Belgium. Pp. 26-33.
- Hunt, S. 1999. Residues Control & Monitoring. Medicine Acts Veterinary Information Service (MAVIS). 30: 12 - 14.
- INDECOPI. 2003 Leche y Productos lácteos: Leche Cruda, requisitos. NTP 202.001.2003. Comisión de reglamentos técnicos y comerciales 4ta edición Lima Perú. Págs.: 09.
- Jevinova, P.; Dudrikova, E.; Sokol, J.; Nagy, J.; Mate, D.; Pipova, M. y Cabadaj, R. 2003. Determination of Oxytetracycline Residues in Milk with the use of HPLC Method and Two Microbial Inhibition Assays. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 47, 211-216.

- Judkins, N.F. y Keener H. 1984. La leche, su producción y sus procesos industriales, Editorial Continental, 2da. Edición.
- Kijak, P. 2004. FDA Validates Rapid Screening Tests for Antibiotics in Milk. *FDA Veterinarian*. XIX (IV) July/August
- Kirk, H.J. 2003. Principios y bases para la prevención de mastitis. Veterinary medical teaching and research center, University of California-Davis. Tulare, CA USA.
- Knappstein, K.; Suhren, G.; Walte, H. 2003. Influence of milking frequency on withdrawal period after application of β -lactams antibiotic-based drugs. *Analytica Chimica Acta*. 438, 241-249
- Lee, H. ; Ryu, P.; Lee, H.; Cho, M. y Lee, M. 2001. Screening for Penicillin Plasma Residues in Cattle by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Acta Vet. Brno*, 70: 353–358.
- Llanos, C.G. 2002. Determinación de residuos de antibióticos en la leche fresca que consume la población de Cajamarca. *Revista Amazónica de Investigación Alimentaria*, Iquitos – Perú. 2 (2) Págs: 35 – 43.
- Loor, J. J. y Jones, G. M. 2001. Prevención de Los Residuos de Medicamentos en La Leche y Vacas de Entesaque (Preventing Drug Residues in Milk and Cull Dairy Cows. *Guías del Ordeño*, Virginia Cooperative Extensión. Virginia State University. Págs: 404-403.
- Low, P.E. y Ezquivel, D. 2002 Resistencia bacteriana. Catedra de Odontología, Universidad Nacional de Colombia, Colombia.
- Magariños, H. 2000. Producción higiénica de la leche cruda. Producción y servicios incorporados. Mixto. Guatemala. Págs. 39-50, 53-62.
- Marín, M. y Gudiol, F. 2003. Antibióticos betalactámicos. *Enferm Infec Microbiol Clin* 21(1):42-55.
- Mestorino, O. N. 2001. Control de residuos químicos en animales productores de leche. *Primeras Jornadas Técnicas de Ciencia y tecnología de Carnes y Alimentos*. Montevideo, Uruguay.

- Moreno, G. B. 2003. Higiene e Inspección de Carnes. Volumen II. Días de Santos: España. Págs. 492-495
- Musser, J.; Anderson, K.; Rushing, J. y Moats, W. 2001. Potential for Milk Containing Penicillin G or Amoxicillin to Cause Residues in Calves. *Dairy Science*. 84: 126-133.
- Neaves, P. 1999. Monitoring Antibiotics In Milk - The Changing World Of Test Methods. Institute for animal health. Reino Unido. En línea: <http://www.iah.bbsrc.ac.uk/BMC/1999/Papers%20&%20posters%201999/Neaves.doc>. Lunes, 17 de Julio del 2006.
- Noa, P.M. S/f. Importancia de los métodos de análisis de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos. Dpto de prevención, Facultad de medicina Veterinaria, Universidad Agraria de la Habana, Cuba.
- NOAH, 2005. National Office of Animal Health. Maximum Residues Limits and the Safety of Food Animals. Topics and Briefing Documents. En línea: <http://www.noah.co.uk/issues/briefingdoc/09-mrls.htm>. Miercoles, 19 Julio del 2006.
- Ocampo, C.L. 2006 Residuos de fármacos en productos de origen animal, Facultad de medicina veterinaria y zootecnia-UNA, México. *Bovinotecnia*, Junio.
- Ocampo L, Rodriguez R. 2001. Determinación del tiempo de retiro de la ordeña de vacas tratadas con preparados intramamarios de sulfametoxazol – trimetropim y sulfadiazina-trimetropim XXV Congreso Nacional de buiatría, Veracruz México. 16- 18 Agosto.
- OIE, 2001. Segunda Conferencia de la OIE sobre la antibiorresistencia. En línea: http://www.ole.intlesp/pross/e_os1001.htm. Miércoles, 19 de Julio del 2006.
- Okolo, M-.I.L.O. 1986. Bacterial drug resistance in meta animals areview. *Internacional journal*. 200 nosis. 13:143-152.

- Ortega, P.M. 1988. Empleo de antibióticos en alimentos para animales y sus consecuencias sobre la salud pública. *La revista de investigación clínica* 40: 463-472.
- Pérez, N. A. F, Vega y León, S Gutiérrez, T. R Díaz, G. G. Monroy H. C Coronado H. M 2005 Residuos de medicamentos veterinarios y plaguicidas organofosforados en leche y derivados .Págs. 2-3
- Poole K. 2001. Multidrug resistance in gram-negative bacteria. *Curr Opin Microbiol*;4:500-8.
- Prescott, J. y Baggot, J. 1991. Terapéutica Antimicrobiana Veterinaria. Ed Acribia. España. Pág. 393 – 398, 371 – 372. 374 – 376,379, 380 – 381.
- Philot, N. 1984. Mastitis Management. Edited by Bason BROS. Co. Illinois. USA.
- Quiroga, G.M. 1993. Mecanismos de Defensa de la glándula mamaria bovina: Revisión de literatura. *Revista de Medicina Veterinaria*. 74 (5): 288-291.
- Ramírez, A. 1989. Aspectos Económicos y Estrategias de Control de la Mastitis Bovina. Curso de medicina Veterinaria Preventiva. Universidad de Puerto Rico. Recinto de Mayagüez.
- Rodríguez, P.D. y Rodríguez, L.C. 1995. Residuos de antibióticos en leche: determinación de cloramfenicol y estreptomina. Apuntes de Salud Pública. Asociación de alumnos y Master en Salud Pública, Instituto Gallego de Salud Pública Galicia. Abril (5) Págs: 15-16
- Sanchez, G.A.; Hernandez, G.M.; Luna, F.J.; Moyano, P.G.; Villanueva, R.M. y Muñoz, C.E. 2001. Riesgos de residuos en leche debido a tratamientos indebidos. Comunicación XVIII. Reunión G-Temcal. COVAP. Septiembre.
- San Martín, B. 1995. Residuos de antibióticos y sulfas en leche. *Tecnovet*, 1(3). Págs. 4.
- Shahani, K.; Whalen, P. 1986. Significance of Antibiotics in Foods and Feeds. En: Agriculture uses of antibiotics. ACS Symposium Series. American Chemical Society. Washington, DC.

- Solbu, H. 1983. Disease recording in Norwegian dairy cattle. I. Disease incidences and non-genetic effects on mastitis, ketosis and "all diseases", *J. Anim. Breed. Genet.* 100: 139-157.
- Spivey JM. 1992. The postantibiotic effect. *Clin Pharm.* 11:865-75.
- Tabburet, A M. 1998. La dosificación de los medicamentos en análisis Químicos Farmacéuticos de medicamentos, Pradeau, D.(ed),UTEHA, Noriega Editores. México, D.F.
- Uribe, H.A. 1998. Cuantificación de factores de riesgo para mastitis, quistes ováricos, hipocalcemia y cetosis usando regresión logística en ganado Holstein. *Arch. Med. Vet.* 30(2)
- Valdez Fernández –Bacsa, Luis Manuel. Resistencia Antibiótica. *Rev. Med. Hered.* Oct. 2003. Vol. 14, Nov. Pag. 155-157.
- Veisseyne, R. 1980. Lactología Técnica. Editorial Acribia. México. Pág. 75 -76.
- Vogelman B, Gudmundsson S, Leggett J, Turnidge J, Ebert S, Craig WA. Correlation of antimicrobial pharmacokinetic parameters with therapeutic efficacy in an animal model. *J Infect Dis* 1988;158:831-47.
- VRC, 2005. Veterinary Residues Committee. En línea: <http://www.vet-residues-committee.gov.uk/> . Miercoles, 19 de Julio del 2006.
- Wattiaux, M. 2000. Mastitis: Prevención y control. Instituto Babcock para la investigación y desarrollo internacional de la Industria Lechera. Universidad de Winsconsin - Madison. En línea: <http://babcock.cals.wisc.edu/downloads/de/24.es.pdf>. Miercoles, 19 de Julio del 2006.
- Yamani, M.; Al-Kurdi, L.; Haddadin, M.; Robinson, R. 1999. A simple test for the detection of antibiotics and other chemical residues in ex-farm milk. *Food Control.* 10, 35-39.
- Ziv, G. 1995. Treatment of mastitis: An overview of progress during the last ten years. *The 3rd International Mastitis Seminar. Session V. May 28-June 1, Tel Aviv, Israel.* pp. 312.

IX. APÉNDICES

ANEXO N° 1:

RESULTADOS DE LA PRUEBA DE CHI CUADRADO

Antibiótico utilizado

Crosstab

			Resultado		Total
			Negativo	Positivo	
Antibiótico	Pen-strep	Count	11	15	26
		% within Antibiotico	42.3%	57.7%	100.0%
	Kan-pen	Count	11	3	14
		% within Antibiotico	78.6%	21.4%	100.0%
	Amx-clav	Count	11	9	20
		% within Antibiotico	55.0%	45.0%	100.0%
Total		Count	33	27	60
		% within Antibiotico	55.0%	45.0%	100.0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	4.835 ^a	2	.089
Likelihood Ratio	5.077	2	.079
Linear-by-Linear Association	.953	1	.329
N of Valid Cases	60		

a. 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 6.30.

Vía de administración

Crosstab

			Resultado		Total
			Negativo	Positivo	
VIA	Intramuscular	Count	14	14	28
		% within VIA	50.0%	50.0%	100.0%
	Intramamario	Count	19	13	32
		% within VIA	59.4%	40.6%	100.0%
Total		Count	33	27	60
		% within VIA	55.0%	45.0%	100.0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	.530 ^b	1	.466		
Continuity Correction ^a	.219	1	.640		
Likelihood Ratio	.531	1	.466		
Fisher's Exact Test				.604	.320
Linear-by-Linear Association	.521	1	.470		
N of Valid Cases	60				

a. Computed only for a 2x2 table

b. 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 12.60.

Nivel de producción

Crosstab

			Resultado		Total
			Negativo	Positivo	
Produccion	Baja	Count	8	7	15
		% within Produccion	53.3%	46.7%	100.0%
	Media	Count	9	12	21
		% within Produccion	42.9%	57.1%	100.0%
	Alta	Count	16	8	24
		% within Produccion	66.7%	33.3%	100.0%
Total		Count	33	27	60
		% within Produccion	55.0%	45.0%	100.0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	2.588 ^a	2	.274
Likelihood Ratio	2.614	2	.271
Linear-by-Linear Association	.982	1	.322
N of Valid Cases	60		

a. 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 6.75.

ANEXO N° 2:

BASE DE DATOS

Establo	Muestra	Numero de Vaca	Tiempo de retiro	Nivel de produccion			Antibiotico empleado	Via de administracion	Resultado
				baja	media	alta			
Establo A	1	2466	3 días			X	PEN STREP	INTR. MUSC.	POSIT
	2	2499	3 días	X			PEN STREP	INTR. MUSC.	POSIT
	3	1645	3 días	X			PEN STREP	INTR. MUSC.	NEG.
	4	c183	3 días	X			PEN STREP	INTR. MUSC.	NEG.
	CONTROL	2798				X	CONTROL		NEG
	5	515	3 días		X		AMOX. AC. CLAVULONICO	INTR. MAM.	POSIT.
	6	622	3 días			X	AMOX. AC. CLAVULONICO	INTR. MAM.	NEG
	7	700	3 días		X		AMOX. AC. CLAVULONICO	INTR. MAM.	NEG
	8	870	3 días		X		AMOX. AC. CLAVULONICO	INTR. MAM.	POSIT.
	9	739	3 días		X		AMOX. AC. CLAVULONICO	INTR. MAM.	POSIT.
	10	5490	3 días		X		AMOX. AC. CLAVULONICO	INTR. MAM.	POSIT.
Establo B	11	980	3 días	X			AMOX. AC. CLAVULONICO	INTR. MAM.	NEG.
	12	631	3 días	X			AMOX. AC. CLAVULONICO	INTR. MAM.	POSIT.
	13	1012	3 días			X	AMOX. AC. CLAVULONICO	INTR. MAM.	NEG.
	14	1433	3 días		X		AMOX. AC. CLAVULONICO	INTR. MAM.	NEG.
	15	986	3 días		X		AMOX. AC. CLAVULONICO	INTR. MAM.	POSIT.

										CLAVULONICO				
16	881	3 días				X				AMOX. AC. CLAVULONICO			INTR. MAM.	POSIT.
17	1022	3 días							X	AMOX. AC. CLAVULONICO			INTR. MAM.	NEG.
18	5697	3 días							X	AMOX. AC. CLAVULONICO			INTR. MAM.	POSIT.
19	5219	3 días							X	AMOX. AC. CLAVULONICO			INTR. MAM.	NEG.
20	701	3 días				X				AMOX. AC. CLAVULONICO			INTR. MAM.	POSIT.
21	915	3 días				X				AMOX. AC. CLAVULONICO			INTR. MAM.	NEG.
CONTROL	682					X				CONTROL				NEG.
22	1200	3 días							X	KANAM. PENICILINA			INTR. MAM.	NEG.
Establo C	1144	3 días							X	KANAM. PENICILINA			INTR. MAM.	NEG.
24	1552	3 días							X	KANAM. PENICILINA			INTR. MAM.	POSIT.
25	1500	3 días				X				PEN STREP			INTR. MAM.	POSIT.
CONTROL	1180								X	CONTROL				NEG.
26	5361	3 días				X				PEN STREP			INTR. MUSC.	NEG.
27	4872	3 días			X					PEN STREP			INTR. MUSC.	NEG.
28	2035	3 días			X					AMOX. AC. CLAVULONICO			INTR. MUSC.	NEG.
Establo D	638	3 días							X	PEN STREP			INTR. MUSC.	NEG.
30	1035	3 días							X	AMOX. AC. CLAVULONICO			INTR. MUSC.	NEG.
31	998	3 días							X	PEN STREP			INTR. MUSC.	NEG.
32	2701	3 días							X	AMOX. AC. CLAVULONICO			INTR. MUSC.	NEG.
CONTROL	5679					X				CONTROL				NEG
33	603	3 días				X				KANAM. PENICILINA			INTR. MAM.	NEG.
Establo E	1644	3 días				X				KANAM. PENICILINA			INTR. MAM.	POSIT.
35	3560	3 días							X	KANAM. PENICILINA			INTR. MAM.	NEG.
36	1430	3 días							X	KANAM. PENICILINA			INTR. MAM.	POSIT.

CONTROL	2220																											
37	1120		3 días	X										PEN STREP											INTR. MUSC.	POSIT.		
38	823		3 días						X					PEN STREP												INTR. MUSC.	POSIT.	
39	1306		3 días	X										PEN STREP												INTR. MUSC.	POSIT.	
40	715		3 días	X										PEN STREP												INTR. MUSC.	POSIT.	
41	821		3 días							X				PEN STREP												INTR. MUSC.	POSIT.	
42	1235		3 días								X			PEN STREP												INTR. MUSC.	POSIT.	
43	5032		3 días	X										PEN STREP												INTR. MUSC.	POSIT.	
44	6025		3 días	X										PEN STREP												INTR. MUSC.	POSIT.	
45	1081		3 días						X					PEN STREP												INTR. MUSC.	POSIT.	
46	1830		3 días						X					PEN STREP												INTR. MUSC.	POSIT.	
CONTROL	2089																											
																											NEG.	
47	A		3 días											KANAM. PENICILINA												INTR. MAM.	NEG.	
48	B		3 días											KANAM. PENICILINA													INTR. MAM.	NEG.
49	C		3 días	X										KANAM. PENICILINA													INTR. MAM.	NEG.
50	D		3 días											KANAM. PENICILINA													INTR. MAM.	NEG.
51	E		3 días	X										KANAM. PENICILINA													INTR. MAM.	NEG.
52	F		3 días											KANAM. PENICILINA													INTR. MAM.	NEG.
53	G		3 días	X										KANAM. PENICILINA													INTR. MAM.	NEG.
54	H		3 días						X					PEN STREP													INTR. MUSC.	NEG.
55	I		3 días						X					PEN STREP													INTR. MUSC.	NEG.
56	J		3 días										X	PEN STREP													INTR. MUSC.	POSIT.
57	K		3 días										X	PEN STREP													INTR. MUSC.	NEG.
58	L		3 días						X					PEN STREP													INTR. MUSC.	NEG.
59	M		3 días										X	PEN STREP													INTR. MUSC.	POSIT.
60	N		3 días						X					PEN STREP													INTR. MUSC.	NEG.
CONTROL	Q																											
																												NEG.