



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



**DETECCIÓN DE RESIDUOS DE ANTIMICROBIANOS,
EN LECHE BOVINA PROCESADA,
MEDIANTE MÉTODOS DE “SCREENING”**

PATRICIO GUILLERMO BRIONES EGUÍA

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario.
Departamento de Ciencias Clínicas.

PROFESORA GUÍA: DRA. BETTY SAN MARTÍN N.

SANTIAGO, CHILE
2005



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



**DETECCIÓN DE RESIDUOS DE ANTIMICROBIANOS,
EN LECHE BOVINA PROCESADA,
MEDIANTE MÉTODOS DE “SCREENING”**

PATRICIO GUILLERMO BRIONES EGUÍA

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario.
Departamento de Ciencias Clínicas.

NOTA FINAL:

| | NOTA | FIRMA |
|--|------|-------|
| PROFESORA GUÍA: DRA. BETTY SAN MARTÍN | | |
| PROFESOR CONSEJERO: DR. LUIS MORAGA | | |
| PROFESORA CONSEJERA: DRA. CONSUELO BORIE | | |

SANTIAGO, CHILE
2005

A mi Hijo

Agradecimientos

Agradezco a todas las personas que me ayudaron a llevar a buen término esta importante etapa de mi vida.

Gracias a la Dra. Betty San Martín, por su constante apoyo y enseñanzas.

Gracias a Odette, Paty, Cecilia, Hernán, Daniela y a todos los integrantes del Laboratorio de Farmacología que ayudaron en alguna parte de este proceso.

Gracias a la Dra. Consuelo Borie y al Dr. Ricardo Moraga, por su ayuda en la corrección de este trabajo.

Gracias a mi madre, por su constante presencia, sus consejos y sus múltiples empujoncitos y ánimos para finalizar este trabajo.

Gracias a mi padre, por ser siempre un ejemplar modelo de hombre y profesional.

Gracias a mi hermano, por su gran disposición y ayuda en todo.

Gracias a mi esposa, que con su amor y alegría me guiaba, paso a paso, y me daba la fuerza para no perder el rumbo.

Gracias a todos mis amigos y compañeros.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| Introducción | 1 |
| Revisión Bibliográfica | 3 |
| - Factores que influyen en un período de resguardo | 4 |
| - Efectos adversos de los residuos de antimicrobianos sobre la salud humana | 6 |
| - Efectos adversos de los residuos de antimicrobianos en la industria lechera | 11 |
| - Origen de los residuos de antimicrobianos en leche | 12 |
| - Detección de residuos de antimicrobianos en leche | 16 |
| - Situación internacional | 21 |
| - Prevención de los residuos de antimicrobianos en la leche | 23 |
| - Situación nacional | 26 |
| Hipótesis y Objetivos | 27 |
| Materiales y Método | 28 |
| - Materiales | 28 |
| - Método | 33 |
| Resultados | 42 |
| Discusión | 48 |
| Conclusiones | 58 |
| Bibliografía | 59 |
| Anexos | 70 |

RESUMEN

Se analizaron 309 muestras de leche (150 en polvo y 159 fluida procesada), correspondientes a productos elaborados por las principales empresas lecheras de Chile, mediante métodos de “screening” para detectar residuos de antimicrobianos en leche bovina. Todas las muestras fueron analizadas por 2 métodos microbiológicos: Delvotest SP (Gist Brocades®) y el método de Cilindros en Placa (A.O.A.C., 1990).

El “screening” microbiológico originó 28 muestras (9,06%) positivas y otras 25 muestras sospechosas. Estas muestras fueron analizadas por los métodos inmuno–enzimáticos Snap β –Lactámicos, Snap Tetraciclina, Cite Probe Gentamicina y Cite Sulfa Trio (IDEXX®).

De las 53 muestras analizadas en la segunda fase, 16 fueron positivas a los métodos inmuno–enzimáticos; 15 con Snap β –Lactámicos (entre éstas, una a Cite Probe Gentamicina) y una con Cite Sulfa Trio. Doce de estas muestras coincidieron con positivas a los métodos microbiológicos y cuatro coincidieron con muestras sospechosas.

Paralelamente, las 159 muestras de leche fluida fueron analizadas por el ensayo de receptor enzimático, específico para β -Lactámicos, Delvotest X–PRESS β L-II (Gist Brocades®). Este método originó 31 muestras positivas, las que también fueron analizadas por Snap β –Lactámicos, resultando negativas en su totalidad. Una de éstas, sí coincidió con un resultado positivo de Delvotest SP.

En resumen, 62 muestras (20,06%) resultaron positivas. 49 de estas muestras (15,86%) resultaron positivas sólo a un método (15 a un microbiológico y 34 a un enzimático), mientras que 13 muestras (4,2%) presentaron resultados positivos al “screening” microbiológico y confirmados inmuno–enzimáticamente.

15 muestras (4,85%) fueron positivas únicamente a los métodos microbiológicos, por lo que no puede establecerse la naturaleza de tal contaminación o si estos resultados correspondieron a falsos positivos.

Se concluyó que tanto en leche en polvo como fluida se detectó contaminación por antimicrobianos. De acuerdo a los resultados de los métodos enzimáticos, la mayor contaminación fue originada por residuos de β –lactámicos. También se detectó gentamicina en una muestra y sulfonamidas, en otra.

El sistema analítico utilizado en este estudio no fue adecuado para detectar todos los residuos de antimicrobianos que pueden encontrarse en la leche producida en Chile, por lo que debiera ser ampliado y perfeccionado para futuros estudios, implementándose métodos más sensibles y más específicos, que abarquen un mayor espectro de antimicrobianos.

Palabras clave: “screening” microbiológico, antimicrobiano, residuo, leche.

SUMMARY

309 samples of milk, 150 dry and 159 fluid processed milk, products from the main dairy companies of Chile, were screened for antimicrobial residues in bovine milk. All samples were processed by two microbiological screening methods: Delvotest SP (Gist Brocades®) and the method of tubes on plates (A.O.A.C., 1990).

28 samples (9,06%) were positive and 25 suspicious with the microbiological screening. These 53 samples underwent further analysis with the immuno-enzymatic methods Snap β -Lactamic, Snap Tetracyclin, Cite Probe Gentamycin y Cite Sulfa Trio (IDEXX®).

Out of these 53 samples, 16 were positive by the immuno-enzymatic methods; 15 were positive with Snap β -Lactamic (one of these was positive by Cite Probe Gentamycin) and another sample was positive with Cite Sulfa Trio. 12 of these positive samples were overtly positive in the screening tests and 4 had suspicious screening results.

The 159 samples of fluid milk were also analyzed by the enzymatic Delvotest X-PRESS β L-II (Gist Brocades®) method. Positive results were obtained for 31 samples, but further analysis by Snap β -Lactamic was negative in all of them. Coincidence between positivity of Delvotest X-PRESS β L-II test and Delvotest SP was found in only one sample.

In summary, an overall number of 62 positive samples (20,06%) was found. 49 out of these (15,86%) displayed positive results with only one method utilized (15 with a microbiological and 34 with an enzymatic), while 13 (4,2%) were positive screened samples confirmed by the immuno-enzymatic methods.

15 samples (4,85%) were positive only by the microbiological methods, therefore the nature of these contaminants, or if these were false positive results, cannot be established here.

It can be concluded that contamination by microbial inhibitors is found both in dry milk and in fluid milk. According to the results of the immuno-enzymatic methods, the most frequent contaminants were β -lactam residues. Also gentamycin and sulfonamide were detected.

The analytical system utilized in this study is not suitable for the detection of every antimicrobial residue potentially found in the milk produced in Chile. More sensitive and selective methods, with a broader spectrum of detection should be applied in further studies in order to better clarify these concerning issues.

Key words: microbiological screening, antimicrobial, residue, milk.

INTRODUCCIÓN

Con el fin de proporcionar alimento de origen animal necesario para satisfacer las demandas de los mercados, tanto nacionales como internacionales, el hombre se ha valido de diversas técnicas de producción, siendo actualmente predominante el sistema de producción intensiva. Este sistema, crecientemente empleado en la producción lechera bovina, permite un mejor aprovechamiento del espacio disponible al aumentar la densidad animal, alcanzando una mayor producción en un menor tiempo y a un mínimo costo.

Tales condiciones de confinamiento, sumadas al estrés productivo, originan un desequilibrio con el medio-ambiente, permitiendo que agentes infecciosos, entre los que adquieren gran importancia los bacterianos, superen las barreras naturales de defensa, afectando la salud y la productividad de los animales, con las respectivas pérdidas económicas.

Los antimicrobianos (antibióticos y sulfas), ya sean con fines terapéuticos (sistémicos o locales) o preventivos, han sido ampliamente utilizados en la medicina veterinaria con el fin de controlar y, en algunos casos, erradicar las enfermedades bacterianas. Pero, estos fármacos se eliminan del organismo de los animales por diversas vías, siendo numerosos los que se excretan conjuntamente con la leche, a la cual pueden llegar por vía sanguínea, por vía intramamaria o por absorción desde cuartos vecinos, pudiendo alcanzar, por períodos variables, concentraciones que pueden ser dañinas para la salud del consumidor y perjudiciales para la industria lechera.

Debido a esto, los residuos de antimicrobianos presentes en la leche deben pesquisarse regularmente, a fin de asegurar un producto inocuo para el consumidor y confiable para la industria lechera, conservando así la insustituible excelencia de este producto animal. Esta detección debe realizarse, idealmente, antes de que la leche salga del predio y llegue a la planta, requiriéndose métodos de fácil implementación bajo tales condiciones.

Diversos métodos de “screening” (de tamizaje o de selección) se han desarrollado para detectar la presencia de residuos de antimicrobianos en muestras de leche obtenidas directamente de la vaca en lactancia o del tanque lechero, los cuales ofrecen las ventajas de ser rápidos, sencillos y de bajo costo.

Existen métodos más específicos, algunos capaces de identificar y cuantificar la droga presente, pero tienen las desventajas de ser lentos, costosos y de difícil empleo, requiriendo de personal especializado, por lo que no resultan convenientes para ser implementados en la lechería. Éstos, sí son útiles para los organismos gubernamentales que controlan la calidad de los alimentos, a objeto de verificar los resultados derivados de los métodos de “screening”.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El uso de antimicrobianos en medicina veterinaria sin lugar a dudas ha sido una de las principales herramientas para el control y erradicación de las enfermedades infecciosas de origen bacteriano, en animales de abasto y compañía (San Martín y Moraga, 1996). Sin embargo, su uso, ya sea con fines curativos o profilácticos en las vacas lecheras, genera concentraciones residuales de estas drogas en diferentes tejidos y fluidos, por períodos variables que se extienden después de finalizada la terapia (San Martín et al., 1995; Mellgren et al., 1996). Debido a esto, casi paralelamente con su introducción, a fines de la Segunda Guerra Mundial, se comenzó a investigar en torno a los efectos adversos que pueden provocar estos residuos en productos destinados al consumo humano, como lo son leche, carne y huevos (Berridge, 1956; Hogg et al., 1992; Gassner y Wuethrich, 1994).

La denominación de residuos, inhibidores o concentraciones residuales corresponde a la presencia de medicamentos que quedan en la leche luego de finalizada una terapia local o sistémica. Sobre la base de las propiedades toxicológicas de las drogas y sus metabolitos, y basados en estudios sobre su ingesta diaria admisible (IDA), los organismos internacionales responsables de los alimentos, tales como la “Food and Agriculture Organization” (FAO), el “Food and Drug Administration” (FDA) de Estados Unidos de América y la “European Agency for the Evaluation of Medicinal Products” (EMEA) de la Comunidad Europea, han establecido límites máximos de residuos (LMR), correspondientes a la máxima concentración de una sustancia química determinada que puede admitirse en un alimento sin que signifique un riesgo para la salud. El ideal es que la leche no contenga sustancias químicas, pero esta condición, difícil de lograr, ha sido reemplazada por el concepto de residuos cuya concentración no produzca efectos adversos sobre el consumidor o, si la salud humana no se encuentra en riesgo, se han determinado niveles que sean indicativos de la aplicación de buenas prácticas agrícolas.

Cada día, este tema adquiere más relevancia, dado que se inserta en la gran problemática de la contaminación ambiental, requiriéndose medidas en el ámbito mundial que salvaguarden de las consecuencias negativas sobre la salud humana, la salud animal y la economía pecuaria. Sin duda, esta contaminación es la consecuencia del descontrol de múltiples procesos productivos inherentes al progreso y debe ser corregida con el conocimiento y esfuerzo multidisciplinario, en el cual las ciencias veterinarias juegan un rol de primer orden (Wishart, 1983).

Los diferentes tipos de residuos de drogas encontrados en alimento de origen animal pueden ser clasificados en cinco categorías: (i) antimicrobianos, (ii) antiinflamatorios, (iii) promotores del crecimiento, (iv) antiparasitarios e insecticidas, y (v) analgésicos y tranquilizantes (Kaneene y Miller, 1997).

De acuerdo a investigaciones de miembros de la “American Association of Bovine Practitioners” (AABP) de Estados Unidos, los fármacos más comúnmente utilizados en vacas lecheras son los antimicrobianos, seguidos por los antiinflamatorios, tranquilizantes y analgésicos (Sundlof et al., 1995).

El establecimiento de los límites máximos de residuos (LMR) y los estudios sobre cinética de antimicrobianos, especialmente de la evolución de sus concentraciones en leche posterior a la administración sistémica o intramamaria, han permitido establecer el período de resguardo, también llamado tiempo de espera o de suspensión, correspondiente al tiempo, en horas o días, que media entre el fin de una terapia sistémica o local y el momento en que las concentraciones de residuos en la leche se encuentran bajo el LMR (McEwen et al., 1991).

Factores que influyen en un período de resguardo.

Cada tiempo de resguardo varía de acuerdo a diferentes factores, como excipientes, condiciones de administración y farmacocinética en la vaca lechera (Booth, 1987).

Estos tiempos no son específicos para cada droga, ya que más importante que el principio activo propiamente tal, en la determinación de estos períodos influyen enormemente las características físico–químicas de la fórmula farmacéutica (Koppinen y Heinonen, 2001).

La oxitetraciclina clorhidrato inyectable, por ejemplo, tiene un período de resguardo en leche de 96 horas, pero si esta droga se vehiculiza con acetamida este lapso aumenta a 9 días, llegando a 14 días si el vehículo es pirrolidona (Mercer, 1988). Lo mismo ocurre con la penicilina sódica, procaínica y benzatínica, cuyos períodos de resguardo son de 48 horas, 96 horas y 9 días, respectivamente (Moretain et al., 1983).

Siguiendo las indicaciones de las empresas farmacéuticas no debieran presentarse problemas de residuos de antimicrobianos en leche (Prange et al., 1984; Anderson et al., 1996). Sin embargo, el estado de salud del animal también puede afectar la farmacocinética de la droga administrada, como ocurre, por ejemplo, frente a deshidratación, en enfermedades que afectan el sistema metabólico o cuando la presencia de infección y/o inflamación causa que la droga se acumule en los tejidos afectados, como ocurre en los cuartos de vacas con mastitis aguda, donde se ha observado una concentración de apramicina hasta diez veces mayor que la registrada en cuartos de vacas sin mastitis (Ziv et al., 1995). En esta materia, Erskine et al. (1995) observaron una excreción de ceftiofur significativamente más prolongada en la leche de vacas con mastitis por *E. coli*, al compararla con la excreción de vacas sanas.

Ciertas drogas antimicrobianas frecuentemente son utilizadas en dosis mayores a las indicadas por el fabricante con el fin de alcanzar mejores concentraciones mínimas inhibitorias en los animales tratados (Kaneene y Miller, 1997). Debe considerarse que una mayor dosis causa un incremento en el tiempo de resguardo (San Martín et al., 1995; Koppinen y Heinonen, 2001), postulándose que existe dosis–dependencia en la duración de estos períodos (Seymour et al., 1988; Oliver et al., 1990).

En el mercado de productos veterinarios existe una gran variedad de preparaciones antimicrobianas de larga acción o liberación retardada, productos que si bien tienen la ventaja de facilitar el manejo de los animales, ya que se han diseñado con el fin de reducir la frecuencia de dosificación manteniendo niveles sanguíneos útiles por un mayor período (habitualmente se administran en dosis única), tienen el inconveniente de que los períodos de resguardo son más prolongados (Mercer, 1988; San Martín y Moraga, 1996). Esto adquiere gran importancia, ya que la tendencia en países con escaso control sobre este factor de riesgo ha sido utilizar antimicrobianos de larga acción en vacas lactantes (San Martín et al., 1995).

Efectos adversos de los residuos de antimicrobianos sobre la salud humana.

Los residuos de antimicrobianos presentes en la leche pueden causar efectos adversos en el consumidor. Algunos de estos efectos se describen a continuación.

- **Hipersensibilidad.**

Potencialmente todos los antimicrobianos de uso en ganado lechero tienen la capacidad de inducir hipersensibilidad, correspondiendo a un fenómeno de contacto en el cual la mayor o menor dosis parece condicionar sólo la intensidad del fenómeno (Allison, 1985).

La mayoría de las manifestaciones clínicas consisten en prurito, erupciones cutáneas o mucosas, edema localizado u otras, casi siempre visibles en el tegumento. Sin embargo, en algunos casos pueden determinar un fenómeno anafiláctico severo (Macintosh, 1990).

La principal información al respecto se refiere a las penicilinas naturales y semi-sintéticas, lo cual puede ser atribuido al gran uso de β -lactámicos, tanto en medicina humana como veterinaria (Ryan et al., 1986).

Si bien es cierto que el número de casos de alergia reportados por el consumo de penicilina en la leche son escasos, es sabido que puede desencadenar estas reacciones en individuos altamente sensibilizados (Dewdney y Edwards, 1984).

Las cefalosporinas provocan reacciones similares a las penicilinas, lo que puede tener relación con la estructura β -lactámica común a ambos grupos de antimicrobianos (Bang y Kammer, 1983; Norrby, 1986).

Respecto a las sulfonamidas, se ha observado que aproximadamente un 3,5% de la población que ha recibido terapia con estas drogas presenta reacciones de hipersensibilidad, siendo este fenómeno más frecuente cuando se utilizan agentes de acción prolongada (Rehm, 1986).

Otros antimicrobianos asociados con reacciones alérgicas de diversa magnitud, son los aminoglucósidos, los macrólidos, las tetraciclinas y las lincosamidas (Gilbert y Sanford, 1983; Laurent y Tulkens, 1987).

Existen diferentes trabajos que confirman la asociación entre reacciones alérgicas y el consumo de alimentos que presentan residuos de antimicrobianos. Así, por ejemplo, Sundlof (1989) describió reacciones dérmicas en humanos, relacionando 5 casos al consumo de leche, 2 al consumo de carne y 1 al consumo de bebida de fruta.

- **Alteraciones de la microflora intestinal.**

Es conocida la colitis pseudo-membranosa asociada a los antimicrobianos, la que puede ser provocada por la mayoría de estas drogas, siendo particularmente común la clindamicina. También se ha asociado a la terapia oral con penicilina, ampicilina, amoxicilina y cefalosporinas, postulándose que es una alteración dosis-dependiente (Barlett, 1990; Gorbach, 1993).

- **Resistencia bacteriana.**

Tanto en medicina veterinaria como humana este problema se debe al uso indiscriminado de antimicrobianos, mala indicación empírica de antibioterapia por ausencia de diagnósticos etiológicos o error diagnóstico, uso de dosis subterapéuticas y presencia de antimicrobianos en alimentos de origen animal o vegetal (Jackman et al., 1990).

Es importante señalar que las bacterias resistentes son capaces de transferir su resistencia a otras bacterias, pudiendo originar resistencia múltiple a un gran número de antimicrobianos (Ortega et al., 1988; Lehtolainen et al., 2003). Además, los factores de resistencia de patógenos, particularmente los que se encuentran en plasmidios u otros factores móviles, pueden diseminarse rápidamente desde los animales a los humanos y al interior de una población humana o animal, especialmente a través del alimento contaminado (Tollefson et al., 1997).

La resistencia bacteriana en medicina veterinaria adquiere aún más relevancia si se considera que existen antecedentes epidemiológicos y clínicos que indican que la presencia de residuos de antimicrobianos en leche, carne y huevos puede contribuir a la proliferación de bacterias resistentes en la flora intestinal del hombre, debido a la presión de selección condicionada por la exposición continua a bajas concentraciones de estas drogas (Calvin, 1985; Tollefson et al., 1997; Tikofsky et al., 2003).

El mayor problema son los animales en lactancia, ya que la leche descartada frecuentemente es dada a los terneros, existiendo un riesgo potencial de inducir este fenómeno (Kaneene y Miller, 1997). De hecho, estudios de Langford et al. (2003) demuestran que la resistencia a Penicilina G, en bacterias de la flora intestinal de terneros, aumenta en directa proporción con la concentración de este fármaco recibido en la leche. En otros casos, esta leche puede llegar a ser utilizada por el personal de la granja y sus familias (Allison, 1985).

Como consecuencia de esto, las drogas utilizadas en el tratamiento de las infecciones bacterianas, tanto en humanos como en animales, se van haciendo crecientemente inefectivas, resultando en enfermedades de mayor duración, aumentando la tasa de mortalidad e incrementando los costos de la salud (Tollefson et al., 1997).

▪ **Efectos tóxicos específicos de los antimicrobianos.**

• Oxitetraciclina.

Su actividad quelante lleva a la formación del complejo tetraciclina orto–fosfato de calcio en dientes y estructuras esqueléticas, interfiriendo con la osificación y dentición normal en lactantes y niños en estado de desarrollo óseo y dentario acelerado. Estos problemas se han observado desde el cuarto mes de gestación hasta el séptimo u octavo año de vida (Moretain et al., 1983; Prescott y Baggot, 1988; Goodman y Gilman, 1996).

• Sulfonamidas.

Presentan un efecto antitiroides, ya que inhibe la absorción de yodo, tanto en humanos como en animales (Casarett and Doull's, 1991; Mellgren et al., 1996).

• Aminoglucósidos.

Tienen el potencial de causar nefrotoxicidad, ya que, por su polaridad, se mantienen fijos a estructuras del riñón por períodos cercanos a los 30 días, lo que es consecuencia de una marcada acumulación en la corteza renal por parte de las células tubulares proximales, donde se concentran cinco a cincuenta veces más que en el plasma, ocasionando necrosis tubular aguda (Lietman y Smith, 1983). Además, pueden causar degeneración de células ciliares a nivel vestibular y coclear (Casarett and Doull's, 1991). Estudios en seres humanos y animales han demostrado que estas alteraciones ocurren debido a una acumulación progresiva en la periferia del oído interno, proceso que podría atribuirse a que la vida media de los aminoglucósidos es cinco a seis veces mayor en los líquidos óticos que en el plasma (Huy et al., 1983).

• Quinolonas y Fluoroquinolonas.

Los perfiles toxicológicos incluyen artropatía y tendinitis en animales jóvenes, nefropatía (con hematuria, nefritis intersticial, insuficiencia renal y cristaluria), efectos en el sistema nervioso central (cefalea, mareos, insomnio, cambios de carácter, confusión, delirio, psicosis, temblores y convulsiones), toxicidad ocular (retinitis), alteraciones de la espermatogénesis, efectos cardio-vasculares (hipotensión arterial, taquicardia, prolongación del segmento QT), posible mutagenicidad y alteraciones cutáneas (con rash, prurito, ampollas hemorrágicas, urticaria y pigmentación en piernas) (Smith, 1986; Stalhamann y Lode, 1989).

El efecto adverso más común se ha localizado en las vías gastrointestinales. Con todos los agentes de este grupo un fenómeno siempre presente es la náusea, incluyendo dolor abdominal, emesis y diarrea. Ha ocurrido colitis pseudo-membranosa, pero es rara (Intefarma, 1995).

- Cloramfenicol.

Provoca alteraciones hepáticas, neuritis óptica y síndrome gris del recién nacido. Sin embargo, el efecto adverso más importante consiste en una depresión de la médula ósea, manifestándose por una menor cantidad de elementos figurados producidos y una diferenciación incompleta de ellos, constituyéndose, este antimicrobiano, en una de las drogas que más comúnmente provoca anemia aplásica (Casarett and Doull's, 1991; Goodman y Gilman, 1996).

Este efecto, de patogenia no bien comprendida aún, puede ser fatal y no es dependiente de la dosis acumulativa. Algunos apoyan la participación de una reacción de hipersensibilidad u otro mecanismo inmunológico (Kucers, 1980).

En Estados Unidos de América, Canadá y Países de la Comunidad Europea, existe tolerancia cero para cloramfenicol en fluidos y tejidos de animales destinados al consumo humano (FDA, 1991), existiendo penalidades a nivel de los productores y plantas procesadoras si se encuentran trazas de esta droga en los productos finales (Keukens et al., 1992).

También en Chile, el Servicio Agrícola Ganadero (SAG, 1995), del Ministerio de Agricultura, prohibió el uso de fármacos que contengan cloramfenicol o cualquiera de sus sales en animales cuyos productos y subproductos, con o sin

industrialización, sean destinados a la alimentación humana (Diario Oficial, 10 de Diciembre de 1996, Resolución exenta N°3399, SAG, Ministerio de Agricultura).

Efectos adversos de los residuos de antimicrobianos en la industria lechera.

La presencia de residuos de antimicrobianos en leche origina serios trastornos tecnológicos en la elaboración de derivados lácteos, ya que la mayoría de ellos ejerce su acción también contra las bacterias lácticas, impidiendo o retardando su desarrollo, o modificando la relación entre los microorganismos que participan en los procesos de fermentación de queso, crema, yogurt y manteca (Allison, 1985; Moats et al., 1995).

Las principales consecuencias tecnológicas son: (i) la formación de una cuajada inadecuada durante la formación de queso, provocando una maduración anormal; (ii) una disminución de la producción de acidez y de flavor durante el proceso de elaboración de la manteca y otros productos fermentados; y (iii) una disminución del crecimiento de los cultivos lácticos cuando se propagan en leche en polvo reconstituida (Castañeda, 2002). En todos los casos, esto lleva a productos con graves defectos, que deben ser descartados, con mayores costos de elaboración, de materia prima y alteración del programa de producción, implicando una pérdida de rentabilidad para la empresa (Brady y Katz, 1988).

Las bacterias lácticas tienen distinta sensibilidad a los agentes antimicrobianos, observándose que la penicilina es el más importante técnicamente, ya que a concentraciones muy bajas (3-4 UI/kg.) se presentan problemas en la acidificación del queso y en la evaluación sensorial a los 3 meses de maduración (Castañeda, 2002).

Existen otros compuestos perjudiciales, tales como la espiramicina, estreptomicina y la tetraciclina. Para ellos los límites de detección de los métodos de “screening” empleados actualmente por la industria lechera son mucho más altos que para

penicilina, sin embargo, bajas concentraciones de estos antimicrobianos en la leche también producen graves defectos en el producto final (Castañeda, 2002).

De todo esto se desprende que dada la diversidad de principios activos utilizados, si no se elige un método de análisis adecuado, se obtienen resultados negativos y el industrial sólo conoce el problema al detectar el defecto en el producto final.

De esta forma, la preocupación existente en torno a la presencia de residuos de antimicrobianos en la leche es fuertemente motivada por razones económicas y de salud pública, siendo la profesión veterinaria esencial en el desarrollo e implementación de prácticas médicas que aseguren la producción de un alimento saludable desde la lechería, donde cada parte involucrada debe estar equipada con las herramientas apropiadas y la información necesaria para proteger la cadena alimenticia (Cullor, 1995; Hillerton et al., 1999).

Origen de los residuos antimicrobianos en leche.

Como es fácil de comprender, la mayor parte de las muestras de leche que contienen concentraciones residuales de antimicrobianos corresponden a vacas que han recibido tratamiento, ya sea a nivel sistémico (inyección intramuscular o subcutánea) o local (intramamario o intrauterino).

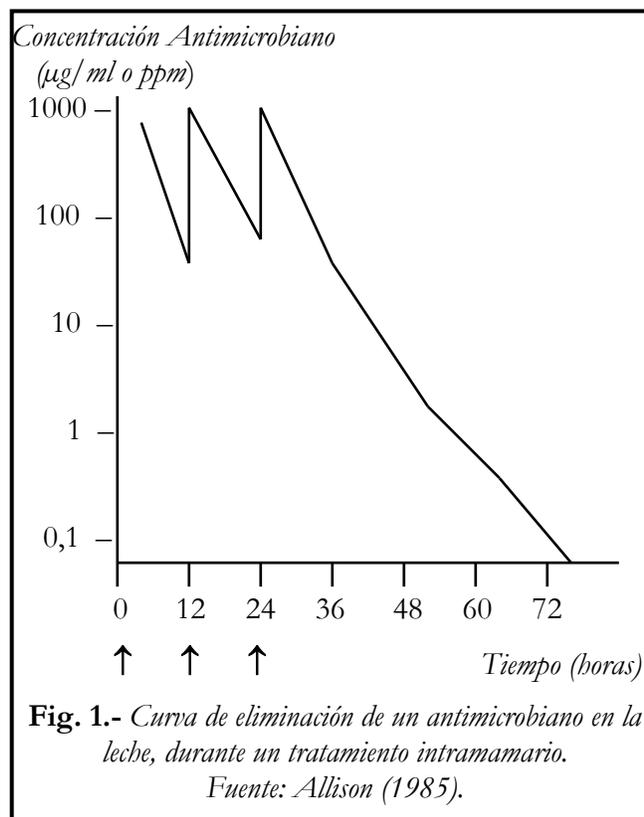
El patrón de muestras positivas a residuos de antimicrobianos en leche pareciera ser estacional, con una mayor incidencia en el post-parto, cuando las vacas entran a la lactancia, con el concomitante aumento en la incidencia de mastitis y el consecuente uso de estos fármacos (Sischo y Burns, 1993).

La principal causa de la presencia de inhibidores en el tanque lechero se asocia al tratamiento intramamario, debido a que alcanza las más altas concentraciones en la leche (Allison, 1985; Knappstein et al., 2004). Un estudio realizado en 1981 por el “Milk Marketing Board” (M.M.B.), organismo que controla la calidad de la leche en Inglaterra, determinó que el 61% de los residuos de antimicrobianos encontrados en la leche provenían de terapias intramamarias de vacas en lactancia, 31% de terapias de secado,

6% de tratamientos parenterales y 2% por otras causas (Booth y Harding, 1986). Similares resultados se encontraron en una investigación realizada en Francia, sobre 1000 vacas en lactancia, donde Fabre et al. (1995) observaron que el 64% de los resultados positivos a inhibidores se originaron por terapia intramamaria a vacas con mastitis, un 25% fue por terapia de secado y un 11%, por otras enfermedades.

En la figura 1, se observa el descenso en la concentración de residuos de un antimicrobiano en la leche, durante y después de un tratamiento con tres preparaciones intramamarias, administradas a tiempo 0, 12 y 24 horas, conteniendo cada una 200 mg. de cloxacilina en una base de liberación rápida.

Aunque las curvas de diferentes antimicrobianos varían en su tiempo de eliminación, la forma del gráfico es típica en la mayoría de los productos utilizados durante la lactancia (Allison, 1985).



Manteniendo en mente la escala logarítmica de la concentración, se aprecia en la figura que el “peak” puede llegar a ser varios miles de veces mayor que el LMR para cloxacilina, correspondiente a 0,01 ppm según el FDA y a 0,03 ppm de acuerdo a la Comunidad Europea y el Ministerio de Salud de Chile.

Al respecto, Wishart (1983) calculó que la leche de una vaca tratada con 200 mg. de penicilina G, en su “peak” de eliminación tiene el potencial de contaminar la leche de 8.000 vacas. Por esto, el efecto de dilución de los residuos en el tanque lechero sólo sería posible hacia el final de la curva de eliminación.

En el caso de las terapias de secado, el “peak” de concentración ocurre durante el período seco, pero puede ocurrir contaminación del tanque a causa de la accidental administración de una preparación para secado a una vaca en lactancia, debido, por ejemplo, a problemas de identificación de los animales, como lo analizan Musser y Anderson (1999).

Los productos para terapia de secado pueden producir residuos en el post-parto reciente, siendo mayor el riesgo frente a cortos períodos de secado o fórmulas de acción prolongada. Así, un gran número de vacas post-parto volviendo juntas al rebaño, pueden producir un efecto aditivo en el tanque lechero, superando el LMR establecido para el antimicrobiano (Allison, 1985). Además, el calostro carece de valor comercial y posee características organolépticas indeseables para la industria lechera, razones por las que se propone un período de resguardo de tres o cuatro días para una vaca post-parto, haya o no recibido antimicrobianos (Egan y Meaney, 1984; Hillerton et al., 1999).

De acuerdo a un estudio realizado en Inglaterra, por J.M. Booth (1982), basado en las razones dadas por los productores que presentaron residuos, las causas de esta contaminación, en orden decreciente de incidencia, fueron:

- Registros insuficientes o inexistentes; el problema se centra en la identificación de los animales tratados, por lo que el riesgo aumenta frente a mayores tamaños de rebaño.
- Falta de retención de la leche por el período señalado por la industria farmacéutica.
- Parto prematuro, asociado a corto período de secado.
- Transferencia accidental de leche en tratamiento.
- Prolongada excreción de la droga.
- Contaminación de los jarros colectores.
- Falta de conocimiento sobre el período de resguardo.
- Retención de la leche sólo desde el cuarto tratado; la absorción de antimicrobianos desde el cuarto tratado y su excreción a través de cuartos no tratados produce residuos que, si bien se encuentran a una concentración menor que en el cuarto tratado, pueden causar resultados positivos en los métodos de detección (Rule et al. 1998).

- Compra reciente de animales en lactancia, los que deberían asumirse como portadores de residuos hasta que se demuestre lo contrario.
- Uso durante la lactancia de fórmulas recomendadas para la terapia de secado.
- Doble dosis.

Muy semejantes fueron las razones observadas entre los productores que presentaron residuos en Suiza, entre los años 1986 y 1988 (Schällibaum, 1990).

Por otra parte, una reciente investigación realizada entre pequeños y grandes productores de los principales distritos lecheros de Kenya, mediante un método microbiológico de difusión en agar, reveló la presencia de inhibidores en un 13% de la leche producida. Esta contaminación fue originada en un 70% por pequeños productores, entre los cuales un cuestionario mostró como las principales causas: (i) el escaso conocimiento sobre los riesgos que representan los antimicrobianos en los alimentos; (ii) registros de tratamientos pobres o ausentes; y (iii) falta de un sistema de monitoreo. Se concluyó que la intensificación de la educación en pequeños y grandes productores reduciría enormemente la ocurrencia de residuos de estos fármacos en la leche (Shitandi y Sternesjo, 2004).

A similares conclusiones llegaron Borges et al. (2000), quienes, también mediante técnicas microbiológicas, encontraron una frecuencia del 9,95% de muestras positivas a inhibidores, en el estado de Goiás, Brazil, durante los años 1997 y 1998.

Detección de residuos antimicrobianos en leche.

La medida más adecuada y más sencilla para evitar la presencia de residuos de antimicrobianos en productos de origen animal destinados a consumo humano, es respetar los períodos de resguardo que recomiendan las industrias farmacéuticas para sus productos; sin embargo, esto no siempre se lleva a cabo (Bishop et al. 1984; San Martín y Moraga, 1996).

Esto ha motivado a que países de gran desarrollo lechero establezcan legislaciones sanitarias gubernamentales que regulan y norman el uso de antimicrobianos y controlan los límites máximos de residuos (LMR) permitidos en los alimentos de origen animal.

Los LMR varían entre países, pero siempre dentro de los márgenes recomendados por el “Food and Drug Administration” (FDA, 1991), de los Estados Unidos de América, la “European Agency for the Evaluation of Medicinal Products” (EMEA), de la Unión Europea (EMEA, 1990) o la “Food and Agriculture Organization” (FAO) en conjunto con la Organización Mundial de la Salud (OMS), a través de la Comisión del Codex Alimentarius (1993). La primera referencia es el Codex Alimentarius, por ser actualmente el marco legal que rige el comercio internacional, de acuerdo a lo resuelto por la Organización Mundial de Comercio (OMC) en 1994 y, subsidiariamente, se deberán cumplir las normas de los países importadores en particular, siempre que sus exigencias no contravengan las normas del Codex y supongan simples barreras para-arancelarias (Codex Alimentarius, 1994).

Con el fin de garantizar el cumplimiento de los requisitos relativos a la inocuidad de los alimentos, señalados por los organismos internacionales, los laboratorios deben disponer de métodos analíticos eficaces y prácticos, capaces de detectar, cuantificar e identificar todos los residuos de medicamentos y plaguicidas que puedan estar presentes en los productos de origen animal (McEwen et al., 1991).

Diversos tipos de métodos han sido empleados con el fin de detectar residuos de antimicrobianos en la leche y su aplicación depende básicamente de los recursos económicos a nivel estatal y privado (Shitandi y Kihumbu, 2004).

La Comisión del Codex Alimentarius (1994) clasifica los métodos analíticos en tres tipos, los que se describen a continuación:

- Métodos analíticos tipo I: Se denominan métodos de referencia, ya que ofrecen el mayor grado de confiabilidad en lo que respecta a la cuantificación e identificación de la estructura del analito. Tienen el inconveniente de que la muestra necesita un tratamiento previo y el rendimiento por hora de trabajo es muy bajo, lo que

encarece los costos analíticos. Entre estos métodos puede mencionarse la cromatografía, combinada con un procedimiento de espectrometría de masa, un detector de arreglo de diodos o un detector de fluorescencia.

- ❑ Métodos analíticos tipo II: Suelen determinar la concentración del analito, pero no permiten una identificación inequívoca de su estructura. Una práctica común consiste en utilizar uno de estos métodos como determinativo y un segundo método de este tipo para cuantificar. Entre estos métodos se puede nombrar la cromatografía en capa fina y la cromatografía líquida con detector UV. La mayoría de los métodos analíticos habitualmente empleados son de este tipo.
- ❑ Métodos analíticos tipo III: Proporcionan una información menos definitiva, pero de gran utilidad. Estos procedimientos de ensayo determinan, por lo general, la presencia o ausencia de un compuesto o clase de compuestos, basándose en técnicas no instrumentales. Por estos motivos se les denominan también métodos de selección, semi-cuantitativos o de “screening”, los que son útiles en los programas de control de residuos debido a su gran capacidad muestral, su comodidad y bajo costo. Sin embargo, con estos métodos por sí solos no se pueden adoptar medidas regulatorias; los resultados positivos deben confirmarse con métodos del tipo II o del tipo I (Shitandi y Kihumbu, 2004).

La confiabilidad que ofrece el resultado positivo de un ensayo para residuos de antimicrobianos es muy importante para que la industria lechera tome las decisiones administrativas apropiadas, asegurando que un producto sano está siendo entregado a la planta procesadora. Dos factores esenciales que hay que tener en cuenta en estos métodos son la sensibilidad y la especificidad, determinados por una comparación con un ensayo cuantitativo validado (Cullor, 1995).

Constantemente se realizan investigaciones tendientes a mejorar las técnicas de detección de residuos de antimicrobianos en leche, las que están centradas en dos aspectos fundamentales: ampliar el espectro de detección y mejorar los niveles de

sensibilidad con el propósito de asegurar la pesquisa de concentraciones bajas que sean, a lo menos, iguales a los LMR permitidos internacionalmente (Cullor, 1995).

Entre los métodos de “screening” (métodos analíticos tipo III), los más utilizados actualmente por la industria lechera son los basados en la inhibición microbiológica y los ensayos de unión inmunológica, enzimática o de receptor específico, los que se describen a continuación.

▪ **Métodos microbiológicos.**

Se basan en la capacidad de difusión del antimicrobiano contenido en la muestra de leche sobre un medio de cultivo que contiene un determinado microorganismo. Si la muestra contiene una concentración suficiente de sustancias inhibitorias, el crecimiento del microorganismo será reducido o inhibido. Estos métodos pueden ser colorimétricos como el Delvotest SP®, B.R. Test® y Clinitest®, los que se basan en cambios de coloración del medio debido a metabolitos originados por el desarrollo de los microorganismos; o pueden basarse en círculos o halos, generados por la inhibición del desarrollo bacteriano, medidos alrededor de cilindros de acero o discos de papel de pequeño diámetro que contienen muestras de leche (Cullor, 1992).

Estos métodos no identifican el antimicrobiano ni tampoco entregan su concentración (Van Eenennaam et al., 1993), pero cumplen un rol primario de importancia, ya que son fáciles de implementar, poseen bajos costos y otorgan una adecuada confiabilidad, razones por las que son métodos de elección en el análisis de rutina (Booth y Harding, 1986; Shitandi y Kihumbu, 2004).

Por otra parte, en las secreciones de la glándula mamaria se encuentran normalmente algunas sustancias antimicrobianas naturales, específicas y no específicas, tales como complemento, lactoferrina, lisozimas, ribonucleasas y otros péptidos de bajo peso molecular (por ej.: moléculas similares a defensinas) (Cullor, 1993; Van Eenennaam et al., 1993). Un fenómeno inflamatorio de la glándula mamaria (clínica o subclínica), que resulta en un incremento de la permeabilidad de estas moléculas de defensa desde el sistema circulatorio hacia dicho órgano (Nickerson, 1987), puede causar resultados falsos positivos en estos métodos, como

lo demuestran estudios realizados en vacas cursando un cuadro de mastitis, que no han recibido antimicrobianos (Egan y Meaney, 1984; Okada, 1986; Carlsson et al., 1989; Cullor et al., 1992; Tyler et al., 1992; Nouws et al., 1998). También, durante el post-parto reciente la presencia de inhibidores naturales en el calostro puede originar resultados falsos positivos en los métodos basados en la inhibición del crecimiento bacteriano (Hillerton et al., 1999).

Para evitar estos resultados falsos positivos, antes de ser analizada por estos métodos, la leche debe someterse a 100°C durante 30 segundos (Rama et al., 1985) o a 82°C durante 2 a 5 minutos (Cullor, 1993; Hillerton et al., 1999), con la finalidad de destruir estos inhibidores naturales.

Ciertos ácidos grasos libres, originados por la degradación de la grasa láctea, también tienen actividad antimicrobiana, pudiendo interferir con estos métodos (Egan y Meaney, 1984). Sin embargo, con una adecuada refrigeración de la muestra no debiera haber interferencia de la lipólisis en el ensayo (Andrew, 2000).

La contaminación de la leche con productos para “dipping”, ungüentos mamarios, desinfectantes o sustancias similares, también se ha asociado con falsos positivos de estos métodos (Allison, 1985; Knapstein et al., 2004), aunque estas sustancias tienden a perder su actividad por dilución más fácilmente que un antimicrobiano, ocurriendo este problema sólo en casos de gran concentración (Booth, 1982).

- **Métodos inmunológicos y enzimáticos.**

Dada la necesidad de resultados más específicos y en un menor tiempo, se promovió el desarrollo de ensayos que emplean el principio de receptor inmune o enzimático, correspondiendo a una variación de la bien establecida técnica de ELISA (“Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”). Esencialmente, un antimicrobiano o grupo antimicrobiano (como el anillo β -lactámico, por ejemplo) es capturado mediante la unión específica, ya sea a un receptor inmune o enzimático que se halla inmovilizado en una fase sólida o a través de un receptor de amplio espectro, como los encontrados en determinadas células bacterianas (Cullor, 1992; Reina, 2003).

La mayoría de estos ensayos involucran un principio competitivo, en el cual el antimicrobiano contenido en la muestra compete por el receptor con un antimicrobiano estándar ligado a una enzima. Luego de un período breve de

incubación, la enzima marcadora cataliza una reacción de color o de fluorescencia, cuya intensidad, proporcional a la presencia del antimicrobiano, es comparada con un control. Debido al principio de competencia, una baja intensidad usualmente se interpreta como un resultado positivo, mientras que una intensidad igual o superior al control se asocia con una mayor presencia del residuo marcado y, por lo tanto, constituye una muestra negativa (Cullor, 1993). Este principio tiene muchas de las propiedades de un inmuno–ensayo ideal: es versátil, simple en su realización, emplea reactivos económicos y consigue, mediante el uso de la fase sólida, una separación fácil entre la fracción retenida y la fracción libre (Reina, 2003).

Estos ensayos corresponden a métodos cualitativos, menos económicos que los microbiológicos, pero más específicos y más rápidos (menos de 10 minutos), cuyos fabricantes proveen un lector colorimétrico o un espectrofotómetro para mayor exactitud en la interpretación de los resultados.

Cabe mencionar que algunos experimentos realizados por Andrew (2000), concluyeron que una alta concentración de proteínas en la leche puede ocasionar resultados falsos positivos en estos métodos, debido a reacciones cruzadas por los sitios activos del receptor. Además, dada su alta sensibilidad pueden originar falsos positivos debido a la detección de concentraciones inferiores al LMR (Cullor, 1995).

Situación Internacional.

Desde que los antimicrobianos se constituyeron en el principal elemento de lucha antibacteriana, ha existido preocupación por parte de los países de gran desarrollo lechero, los que han dictado normas que han sido acogidas por otras naciones.

A fines de la década del sesenta, la Organización Mundial de la Salud (OMS) junto a la “Food and Agriculture Organization” (FAO), a través de la Comisión del Codex Alimentarius, elaboran recomendaciones con fines de orientar a los países respecto a las concentraciones permitidas en leche para los antimicrobianos de uso frecuente en el ganado (Keukens et al., 1992), listado que se va incrementando de acuerdo a la continua incorporación de agentes antibacterianos. En Inglaterra, en 1965 el “Milk Marketing Board”, organismo que controla la calidad de la leche, introduce con carácter de obligatorio un ensayo para detectar residuos de antimicrobianos en leche, dictando normas sobre el manejo de estos fármacos en la vaca lechera (Booth y Harding, 1986).

En la misma década, el FDA dictó normas para controlar la presencia de residuos de antimicrobianos en alimentos de origen animal, estableciendo sanciones para quienes contravengan estas disposiciones. En la actualidad, este organismo controla la calidad de la leche a través del “Pasteurized Milk Ordinance” (PMO) (FDA, 1990).

Una de las principales disposiciones del FDA está dirigida al etiquetado de los productos farmacéuticos, estableciendo que debe indicarse la vía de administración, la dosis y el tiempo de eliminación (período de resguardo) de las drogas en leche y carne, además de sus condiciones de almacenamiento en el predio. También señala que los productos farmacéuticos utilizados en vacas lactantes deben ser separados de aquellos destinados a vacas no lactantes, según detalla el Apéndice N del PMO, de abril de 1991, descrito por Wayne (1993).

En Estados Unidos, actualmente existe un reducido número de antimicrobianos aprobados para el tratamiento de enfermedades bacterianas en vacas lecheras, diferenciando entre período de lactancia y período seco, e incluso entre vías de administración. Así, por ejemplo, para el tratamiento intramamario de vacas lecheras en producción, los antimicrobianos aprobados son: amoxicilina, cefapirina, cloxacilina, eritromicina, hetacilina, novobiocina, penicilina y pirlimicina.

Para el tratamiento inyectable de vacas lecheras en producción, el FDA dispuso que se pueden emplear: amoxicilina, ampicilina, cefalosporina, eritromicina, oxitetraciclina y sulfadimetoxina. Por otro lado, para el tratamiento intramamario de ganado lechero durante el período seco los antimicrobianos aprobados corresponden a: cefapirina, cloxacilina, dihidro–estreptomina, eritromicina, novobiocina y penicilina (Pharmacia & Upjohn Company, 2001). Además, el “Food and Drug Administration” (FDA, 1991) prohibió el uso de algunos antimicrobianos, tales como cloramfenicol, vancomicina, furazolidona, nitrofurazona, fluoroquinolonas y algunas sulfonamidas, en animales productores de alimento, debido al riesgo que su utilización representa para el consumidor.

Estas restricciones se acompañan de una legislación apropiada que permite controlar periódicamente los límites máximos de residuos (LMR) en el tanque o en el camión lechero. Así, por ejemplo, el FDA, a través del “Pasteurized Milk Ordinance” (PMO), regularmente examina, para residuos de β -lactámicos, todos los camiones–cisterna que

transportan la leche desde la granja hacia la planta. En caso de que una muestra resulte positiva, se la volverá a analizar en duplicado, con controles negativos y positivos, a la vez que se analizarán muestras del tanque de cada productor, usando el mismo método con el cual se analizó la muestra original. La leche contaminada no puede ser procesada y deberá ser desechada (Adams, 1994).

Las sanciones a los productores de leche con residuos de antimicrobianos varían entre países. En Inglaterra, por ejemplo, a través del “Milk Marketing Board” (MMB), la leche de cada productor es revisada al menos una vez por semana, castigándose el precio de la leche desde la primera falla, castigo que es mayor a la segunda falla y a la tercera, debiendo, en todo caso, pasar seis meses produciendo leche libre de residuos para volver a la situación inicial. Además, un productor puede ser demandado si se demuestra que su leche causó pérdidas económicas por contaminación de un silo o de un tanque lechero, haciendo a esta leche inadecuada para su consumo. Sin embargo, si se produce un error que contamina el tanque lechero y esta situación es notificada al MMB antes que la leche sea recolectada o muestreada, existe un seguro que compensa al productor por sus pérdidas económicas, el cual opera sólo una vez al año (Allison, 1985).

La prioridad de los sistemas de monitoreo en Estados Unidos ha sido eliminar los falsos negativos, lo que ha conducido a la aprobación de ensayos muy sensibles, con límites de detección por debajo del LMR, lo que ha ocasionado el consiguiente incremento de resultados falsos positivos (Cullor, 1995).

Cabe mencionar que en 1991 el FDA señaló que sobre el 1% de la leche producida en Estados Unidos estaba contaminada con un exceso de residuos (Moats et al., 1995) y en 1994 se descartaron 1.627 partidas de leche, de las cuales posteriormente se confirmaron sólo 23 como positivas (Cullor, 1995).

Debido a estos antecedentes, si el productor no está conforme con un resultado positivo, el organismo gubernamental correspondiente debe realizar el análisis químico del contaminante y de su concentración. Si el resultado define que la concentración es igual o inferior al LMR, un seguro reembolsa al productor las pérdidas por la leche eliminada (Adams, 1994).

Si bien existen normas y controles gubernamentales eficientes tanto en Estados Unidos como en Europa, no se ha podido dar una solución definitiva a este problema, ya que por diferentes razones los residuos de antimicrobianos siguen aún presentes en la leche.

Es interesante mencionar que se ha logrado disminuir su incidencia. Así, por ejemplo, en Estados Unidos, de un 13% en el año 1962, bajó a un 1,7% en el año 1990 (Weaver, 1992), mientras que en los países de Europa, el año 2000, la frecuencia de muestras positivas a inhibidores se encontró entre 0,03% y 0,14% (Suhren, 2002).

Prevención de los residuos antimicrobianos en la leche.

Es destacable la iniciativa de la Federación Nacional de Productores de Leche de Estados Unidos que, en conjunto con la Asociación Médica Veterinaria Americana, desarrollaron un programa con el objetivo de promover el uso responsable y controlado de los antimicrobianos en la industria lechera. Este protocolo de prevención de residuos fomenta el concepto de análisis y control de puntos críticos de riesgo (HACCP), aplicado al ambiente y al manejo en la lechería.

Básicamente, este programa se puede resumir en 10 puntos importantes, descritos por Adams (1994) y analizados por Calvino (2003), los que se describen a continuación:

1. “Implementar prácticas de manejo tendientes a mejorar y mantener la salud del rebaño”– La aplicación de programas sanitarios preventivos, para mastitis y para otras enfermedades, reduce la necesidad del tratamiento de animales con antimicrobianos.
2. “Establecer una buena relación entre médico veterinario, cliente y paciente”.
3. “Emplear sólo medicamentos aprobados por el FDA”– El uso de drogas aprobadas por la autoridad sanitaria, siguiendo las instrucciones del prospecto, garantiza tanto la seguridad para el animal como la ausencia de residuos en leche. En Estados Unidos las drogas se clasifican en tres categorías: (i) drogas de venta libre, que no requieren ninguna recomendación especial para su uso; (ii) drogas prescritas por el veterinario (deben llevar nombre y dirección de quien las prescribió); y (iii) drogas que se emplean en forma distinta a la indicada en el prospecto (deben llevar nombre

y dirección de quien las prescribió, instrucciones de uso, período de retiro y advertencias).

4. “Asegurar que todas las drogas tengan etiquetas que cumplan con los requerimientos de organizaciones estatales y/o federales”– Está claramente indicado en los prospectos si la droga puede o no ser administrada a vacas en lactancia, las contraindicaciones y advertencias para el operador y cual es la temperatura de almacenamiento del producto. Sin embargo, el número de antimicrobianos aprobados para terapia sistémica de vacas lecheras no es alto, lo cual hace que en determinados casos se recurra a usar fármacos en forma no estipulada por el prospecto, ya sea en diferente dosis, otra vía de administración, otra clase de animales o para enfermedades no descritas en el prospecto. El veterinario puede prescribir el uso fuera de etiqueta si se cumplen los siguientes requisitos: (i) diagnósticos cuidadosos, (ii) inexistencia de una droga específica para tratar el caso diagnosticado o necesidad de una dosis mayor a la recomendada, (iii) asegurar la correcta identificación del animal tratado y (iv) disponer de un tiempo de retiro prudencial.
5. “Almacenar todos los medicamentos correctamente”– Las drogas deben ser almacenadas en lugares específicos de acuerdo con su uso. Si bien en nuestro país no existe una reglamentación oficial, sí existe en los países desarrollados, quienes como importadores, hacen cumplir en otros países sus requisitos en aquellos establecimientos con instalaciones y manejo aprobado para exportar leche.
6. “Administrar los agentes terapéuticos correctamente e identificar todos los animales tratados”– Es imprescindible que el o los ordeñadores conozcan qué vacas han sido tratadas para poder darle a la leche el destino adecuado. Si bien los métodos pueden variar de predio a predio, el objetivo siempre es evitar la mezcla de leche normal con leche proveniente de animales tratados, considerando que las vacas en tratamiento antimicrobiano deben ser ordeñadas en último término.
7. “Utilizar y mantener registros de tratamientos apropiados de todos los pacientes”– Este registro incluye identidad de la vaca, la persona que administró el antimicrobiano, el tipo de tratamiento, dosis, fecha y hora (o tiempo de ordeño) del tratamiento y tiempo de retiro de la leche de la vaca tratada.

Las formulaciones de secado tienen una base oleosa para prolongar el tiempo de eliminación de la droga. Esto puede determinar la presencia de residuos al parto, si la parición se produce antes de la fecha prevista. Es por lo tanto necesario registrar la fecha de secado tal como se registran los tratamientos durante la lactancia.

8. “Implementar el uso de pruebas para detectar residuos de antimicrobianos, principalmente antes de que el animal retorne a la producción”– Esta práctica está especialmente indicada en aquellos casos en que se hizo un uso de la droga distinto al recomendado en el prospecto. El método analítico que se utilice debe ser el mismo que se ocupa en la planta lechera, o al menos uno comparable.
9. “Capacitar a los empleados en relación con las características de los medicamentos, con el objeto de difundir un uso adecuado”– La responsabilidad del manejo de los fármacos deberá recaer sobre personas capacitadas dentro del personal del establecimiento. Se las deberá instruir sobre el uso de drogas, identificación de animales, mantenimiento del registro de tratamientos, mantenimiento del inventario de fármacos y correcta administración.
10. “Chequear anualmente el protocolo de prevención de residuos en leche”– Los cambios de personal, el uso alternativo de drogas, cambios en la metodología de detección de residuos y otras variables, pueden causar la ruptura en el programa de prevención de la presencia de residuos, obligando a la revisión del mismo con cierta regularidad.

Situación Nacional.

El Reglamento Sanitario de los Alimentos (1997) indica que la leche debe estar exenta de antisépticos, antimicrobianos y sustancias alcalinas (Título II, Párrafo II, artículo 33, letra h), pero el control sobre este aspecto, tanto a nivel de los productores como de las plantas lecheras, es más bien escaso, ya que en Chile no existe una normativa que regule la adquisición y el uso de antimicrobianos en vacas lecheras.

A partir del año 1997, el Servicio Nacional de Pesca (SERNAPESCA) lleva un Programa de Control de Residuos de Antimicrobianos en las especies salmonídeas y, en Diciembre de 1998, se diseñó e implementó el Plan Nacional de Control de Residuos de Medicamentos en aves y cerdos, a cargo del Servicio Nacional de Salud y el Servicio

Agrícola Ganadero. Dentro de este plan, los antimicrobianos son considerados como los residuos de mayor riesgo.

En Octubre de 1999, el Ministerio de Salud publicó LMR para los antimicrobianos más utilizados en la producción lechera, pero a la fecha no se han establecido normas gubernamentales que permitan garantizar que se está destinando para consumo público sólo leche libre de inhibidores.

Las empresas lecheras rutinariamente realizan pruebas para detectar antimicrobianos, en forma simultánea al análisis de la calidad composicional y microbiológica de la leche que ingresa a la planta. Desafortunadamente, esta detección sólo discrimina entre la leche que será destinada al procesamiento industrial de derivados lácteos y la que será distribuida al consumidor.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, el presente trabajo tiene por finalidad detectar la presencia de residuos de antimicrobianos en leche bovina procesada, producida en las principales plantas lecheras de Chile, mediante métodos de “screening”.

HIPÓTESIS

La leche, como producto final, presenta concentraciones residuales de antimicrobianos.

OBJETIVOS

Objetivo General.

Detectar la presencia de residuos de antimicrobianos en leche bovina en polvo y fluida procesada, mediante métodos de “screening”.

Objetivos Específicos.

1. Detectar residuos de antimicrobianos en leche en polvo y fluida procesada, mediante los métodos microbiológicos Delvotest SP® y el método de Cilindros en Placa.
2. Detectar residuos de antimicrobianos en muestras de leche fluida procesada, mediante el ensayo de receptor enzimático Delvotest X-PRESS β L-II®.
3. Analizar, mediante métodos inmuno-enzimáticos, las muestras de leche en polvo y fluida que resultaron positivas y sospechosas al “screening” microbiológico.
4. Analizar, mediante Snap β -Lactámicos, las muestras de leche fluida que resultaron positivas a Delvotest X-PRESS β L-II®.

MATERIALES Y MÉTODO

El Ministerio de Agricultura de Chile, a través de la Comisión Nacional de la Leche, a fines de 1998 decidió realizar una prospección sobre la presencia de residuos de antimicrobianos en productos lácteos, elaborados a nivel nacional.

La proposición técnica fue estructurada en forma conjunta por el Laboratorio de Farmacología (Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile) y el Laboratorio de Servicios de Referencia (Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (Icytal), Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile).

Se conformó un equipo de trabajo formado por los dos laboratorios mencionados, el Servicio Agrícola Ganadero (SAG) y el Ministerio de Salud. Las empresas lecheras contribuyeron con el financiamiento del presupuesto del proyecto.

1. MATERIALES.

1.1. Muestras de leche.

Las muestras se obtuvieron de 15 plantas procesadoras de leche, localizadas en las regiones VIII, IX, X y Metropolitana, las que, en conjunto, fueron representativas del **74,3%** del total nacional de leche cruda recibida en las plantas que informan a ODEPA, durante el año 1999.

Las plantas muestreadas contribuyeron con el **94,08%** del total de leche fluida procesada elaborada en el país y con el **97,79%** del total de leche en polvo elaborada en el mismo año, de acuerdo a la información entregada por el Ministerio de Agricultura, a través del Boletín de la Leche, publicado por la Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA, 1999).

El Ministerio de Salud consideró tomar un total de 284 muestras de leche en polvo y 318 de leche fluida, de las cuales en el Laboratorio de Farmacología se llevó a cabo el análisis de 150 y 159 muestras, respectivamente. El número de muestras inspeccionadas por bodega y por tipo de leche, fue proporcional a la producción por planta informada en el Boletín de la Leche, entre Enero y Octubre de 1998.

La Tabla 1 muestra la recepción y elaboración de leche, a nivel nacional, durante el año 1999, destacando en negrita a las plantas participantes de la muestra.

Tabla 1
Resumen nacional de recepción y elaboración de leche fluida y en polvo,

por las plantas lecheras de Chile, en 1999.
(Se destacan en negrita las plantas lecheras que participaron de la muestra).

| REGIÓN | NOMBRE DE LA PLANTA | RECEPCIÓN LECHE FLUIDA | | ELABORACIÓN LECHE FLUIDA | | ELABORACIÓN LECHE EN POLVO | |
|--------|------------------------------|------------------------------|--------------|--------------------------------|--------------|----------------------------------|--------------|
| | | Litros | % | Litros | % | Kilos | % |
| RM. | SOPROLE (SAN JOAQUÍN) | 152.215.110 | 10,35 | 115.733.341 | 41,41 | - | - |
| RM. | NESTLÉ (MACUL) | - | - | - | - | - | - |
| RM. | QUILLAYES-PETEROA | 19.133.848 | 1,3 | - | - | - | - |
| RM. | LOS FUNDOS (EL MONTE) | 17.362.639 | 1,18 | - | - | - | - |
| VIII | PARMALAT (CHILLÁN) | 24.652.132 | 1,67 | 18.087.360 | 6,50 | 353.436 | 0,58 |
| VIII | NESTLÉ (LOS ÁNGELES) | 61.962.426 | 4,22 | - | - | - | - |
| VIII | SOPROLE (LOS ÁNGELES) | 55.121.570 | 3,75 | 16.590.854 | 5,91 | - | - |
| IX | PARMALAT (VICTORIA) | 67.066.885 | 4,56 | - | - | 5.665.559 | 9,35 |
| IX | CALÁN LTDA. (ANGOL) | 13.167.347 | 0,89 | 1.135.659 | 0,40 | 97.086 | 0,16 |
| IX | SOPROLE (TEMUCO) | 31.512.977 | 2,14 | - | - | - | - |
| IX | LONCOLECHE (LONCOCHE) | 54.477.384 | 3,70 | 61.265.400 | 21,92 | 240.000 | 0,39 |
| IX | NESTLÉ (PITRUFQUÉN) | 21.012.035 | 1,43 | - | - | 1.836.900 | 3,03 |
| IX | LB IND. ALIM. S.A. (TEMUCO) | 718.787 | 0,05 | - | - | - | - |
| X | COLÚN (LA UNIÓN) | 213.179.136 | 14,50 | 40.702.828 | 14,56 | 2.299.249 | 3,79 |
| X | SOPROLE (LOS LAGOS) | 60.425.150 | 4,21 | - | - | 736.450 | 1,21 |
| X | LONCOLECHE (VALDIVIA) | 69.737.275 | 4,74 | - | - | - | - |
| X | SOPROLE (OSORNO) | 113.125.552 | 7,70 | - | - | 8.736.830 | 14,43 |
| X | NESTLÉ (OSORNO) | 114.422.571 | 7,78 | - | - | 15.335.610 | 25,30 |
| X | LONCOLECHE (OSORNO) | 97.350.330 | 6,62 | - | - | 12.285.825 | 20,27 |
| X | CAFRA (FRUTILLAR) | 37.027.175 | 2,52 | 6.979.748 | 2,50 | 611.121 | 1,02 |
| X | NESTLÉ (LLANQUIHUE) | 133.669.936 | 9,09 | 18.582.799 | 6,65 | 11.387.160 | 18,80 |
| X | CHILOLAC (ANCUD) | 26.599.862 | 1,81 | 231.573 | 0,08 | - | - |
| X | U. AUSTRAL (VALDIVIA) | - | - | 169.634 | 0,06 | - | - |
| X | SOALVA (PUERTO VARAS) | 24.798.279 | 1,68 | 2.320 | 0,01 | 993.499 | 1,64 |
| X | AGROLÁCTEOS CUINCO (OS.) | 4.852.126 | 0,3 | - | - | - | - |
| X | QUILLAYES-PET. (FUTRONO) | 13.839.668 | 0,94 | - | - | - | - |
| X | CAMPO LINDO (RÍO NEGRO) | 1.240.309 | 0,08 | - | - | - | - |
| X | CUMELÉN Mulpulmo (OS.) | 41.045.783 | 2,79 | - | - | 17.935 | 0,03 |
| TOTAL | | 1.469.716.292 | 100,0 | 279.481.516 | 100,0 | 60.596.660 | 100,0 |

Fuente: Boletín de la Leche, publicado en 1999 por ODEPA, basándose en los antecedentes proporcionados por las Plantas Lecheras.

1.2. Método Microbiológico de Cilindros en Placa.

1.2.1. Medios de cultivo:

A. Para Quinolonas.

| | |
|--------------------------------|-----------|
| Peptona de carne | 0,865 gr. |
| Peptona de caseína | 0,865 gr. |
| Cloruro de sodio | 1,275 gr. |
| Agar granulado | 3,250 gr. |
| Dihidrógeno fosfato de potasio | 0,025 gr. |
| Agua destilada (c.s.p.) | 250 ml. |
| → Ajustado a pH 6,0 | |

B. Para β -Lactámicos. Medio 8 (Difco®).

→ Ajustado a pH 6,0

C. Para Aminoglucósidos. Medio 8 (Difco®).

→ Ajustado a pH 8,0

D. Para Tetraciclinas. Medio 8 (Difco®).

→ Ajustado a pH 5,85

1.1.2. Cepas bacterianas y sensidisco control.

| Tipo de medio | Cepa bacteriana | Sensidisco control |
|---------------------|---------------------------------------|---|
| Quinolonas | <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 | Enrofloxacino 10 μ g. (ARLAB®) |
| β -Lactámicos | <i>Sarcinea lutea</i> ATCC 9341 | Cefquinoma 10 μ g. (Hoechst®) |
| Aminoglucósidos | <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 | Gentamicina 10 μ g. (ARLAB®) |
| Tetraciclinas | <i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778 | Oxitetraciclina 30 μ g. (ARLAB®) |

El origen de las cepas bacterianas fue “American Type Culture Collection” (ATCC), obtenidas de Difco Laboratories® o de Merck®.

1.1.3. Equipo de laboratorio.

- Refrigerador.
- Estufa de cultivo de 37°C y de 30°C.
- Agitador de tubos.
- Peachímetro.
- Cilindros metálicos de 200 µl.
- Vernier de precisión.
- Balanza digital.
- “Multi-Block Heater” (Lab-Line, Arquimed®) (foto en Anexo 3).
- “Image Reader” (Lab-Line, Arquimed®) (foto en Anexo 3).
- Incubadora-Agitadora Delvotest X-PRESS βL-II (Gist Brocades®) (foto en Anexo 2).
- Incubadora para Delvotest SP (Gist Brocades®) (foto en Anexo 1-A).

1.1.4. Material fungible.

Correspondiente al material de uso habitual en el Laboratorio de Farmacología.

1.2. Método Delvotest SP (Gist Brocades®, Holanda).

Es una prueba microbiológica de tipo colorimétrico, basado en la inhibición de *Bacillus stearothermophilus*, var. *calidolactis* C953, que está aprobada por la EMEA y el FDA para la detección de residuos de antimicrobianos en leche bovina.

Todos los materiales y equipos necesarios para la realización de este ensayo los provee el fabricante de la prueba (Gist Brocades®). Éstos, se muestran en el anexo 1-A.

1.3. Método Delvotest X–PRESS β L-II (Gist Brocades®, Holanda).

Ensayo competitivo de receptor enzimático, específico para detectar residuos de β -lactámicos en leche fluida bovina, que cuenta con la aprobación de la EMEA y el FDA para la detección de residuos de antimicrobianos en leche bovina.

El equipo y los materiales necesarios para su realización los provee el fabricante de la prueba (Gist Brocades®) y se muestran en el anexo 2.

1.4. Métodos inmuno–enzimáticos (IDEXX® Laboratories Inc., EE.UU.).

Son ensayos cualitativos, de unión a un receptor inmune asociado a una reacción enzimática. Corresponden a ensayos rápidos aprobados por la EMEA y el FDA para la detección de residuos de antimicrobianos en leche bovina.

Los equipos y materiales necesarios para la realización de los ensayos los provee el fabricante (fotos en anexo 3).

1.4.1. Snap β -Lactámico (IDEXX®).

Detecta residuos de penicilina G, amoxicilina, ampicilina, ceftiofur y cefapirina, en leche bovina. Además, presenta reacción cruzada con cloxacilina, dicloxacilina, ticarcilina y cefadroxilo, pero a una concentración superior al LMR.

1.4.2. Snap Tetraciclina (IDEXX®).

Detecta residuos de tetraciclina, oxitetraciclina y clortetraciclina, en leche bovina.

1.4.3. Cite Sulfa Trio (IDEXX®).

Detecta residuos de sulfatiazol, sulfametacina y sulfadimetoxina, en leche bovina.

1.4.4. Cite Probe Gentamicina (IDEXX®).

Detecta residuos de gentamicina, en leche bovina.

2. MÉTODO

2.1. Toma de muestras.

El Ministerio de Salud, a través del Departamento de Programa del Ambiente, en conjunto con el Departamento de Protección Pecuaria del SAG, elaboraron el programa de toma de muestras y llevaron a cabo la inspección sobre lotes de producto envasado para la venta a público, almacenado en las bodegas de las plantas.

Se contempló realizar la prospección en dos etapas; la primera, comprendió el análisis de leche en polvo y la segunda, de leche fluida procesada (pasteurizada y UHT). En el caso de la leche en polvo, la inspección incluyó tanto leche entera como descremada, sin estratificar por formato (contenido neto). En el caso de la leche fluida, la inspección abarcó leche UHT con diferentes contenidos de materia grasa (entera, semi-descremada y descremada) y leche pasteurizada.

Se trató de abarcar el máximo de fechas de elaboración presentes en la bodega, pero seleccionando las unidades aleatoriamente.

Las muestras de leche en polvo fueron seleccionadas entre el 3 de Febrero y el 16 de Marzo de 1999 y las muestras de leche fluida, entre el 21 de Junio y el 2 de Noviembre de 1999. En la inspección de leche fluida se abarcó un período más prolongado con el propósito de no repetir fechas de elaboración.

Para el manejo y despacho de las muestras se siguió un instructivo preparado por el Ministerio de Salud.

En términos generales, las muestras de cada inspección (de cada etapa y bodega) se distribuyeron por partes iguales a los dos laboratorios participantes, incluyéndose el máximo de fechas de elaboración en cada una de ellas. Una excepción a este criterio fue la leche pasteurizada, ya que todas las muestras de una misma bodega se enviaron al laboratorio más cercano, para evitar su alteración.

A continuación se describe el análisis realizado a 150 muestras de leche en polvo y 159 muestras de leche fluida, recibidas por el Laboratorio de Farmacología.

2.2. Análisis de las muestras.

Todos los análisis de este estudio fueron desarrollados en el Laboratorio de Farmacología del Departamento de Ciencias Clínicas, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

El objetivo de esta tesis se refirió a una prospección de la producción lechera nacional, por lo que no se distinguieron las muestras por tipo de leche, contenido de materia grasa ni planta de origen, respetando la integridad de imagen de las plantas lecheras que, voluntariamente, formaron parte de este estudio.

La primera fase del estudio consistió en un “screening” microbiológico, para el cual se llevó a cabo el análisis de todas las muestras mediante los cuatro medios de cultivo del método de Cilindros en Placa y mediante el método rápido Delvotest SP, ambos basados en la inhibición del crecimiento de bacterias específicas.

Paralelamente, todas las muestras de leche fluida fueron analizadas mediante el ensayo de receptor enzimático Delvotest X-PRESS β L-II. Las muestras de leche en polvo no pudieron ser analizadas por este ensayo debido a una restricción técnica del fabricante (Gist Brocades®, Holanda), respecto a la leche reconstituida. Las muestras positivas fueron analizadas por el ensayo inmuno-enzimático Snap β -Lactámico.

En la segunda fase, se analizaron todas aquellas muestras que resultaron positivas en la primera fase y aquellas sospechosas con alguno de los métodos microbiológicos, es decir, que presentaron un halo menor a 12 mm. (método de Cilindros en Placa) o que mostraron sólo un ligero cambio de coloración del medio de cultivo (método Delvotest SP), ambas características insuficientes para determinar una muestra como positiva.

Para esta segunda fase se utilizaron los métodos inmuno–enzimáticos Snap β –Lactámico, Snap Tetraciclina, Cite Probe Gentamicina y Cite Sulfa Trio (IDEXX®, EE.UU.).

2.2.1. Reconstitución de la leche antes del análisis.

Las muestras de leche en polvo fueron reconstituidas con agua destilada estéril, de acuerdo a las indicaciones del fabricante, impresas en el envase, con concentraciones para leche entera entre 10 y 13 gr./100 ml. y de 9 gr./100 ml., para leche descremada.

Las muestras de leche fluida fueron analizadas directamente, gracias a que los tratamientos térmicos realizados para mejorar la calidad microbiológica de la leche (pasteurización y UHT), son suficientes para destruir los inhibidores naturales que pueden causar resultados falsos positivos en los métodos microbiológicos (Van Eenennaam et al., 1993).

2.2.2. Conservación de las muestras.

Las muestras de leche fluida, después de abierto el envase original, fueron conservadas a -18°C , en tubos de vidrio. Las muestras de leche en polvo se conservaron en bolsas de plástico, dentro de recipientes aislantes de plumavit, a temperatura ambiente.

2.3. Método Microbiológico de Cilindros en Placa.

Se utilizó como referencia la Técnica Microbiológica de Cilindros en Placa, estandarizada por la “Association of Official Analytical Chemist” (A.O.A.C., 1990) y modificada por San Martín y Moraga (1996), para detectar residuos de antimicrobianos en leche y otros fluidos biológicos de origen animal.

2.3.1. Dilución de microorganismos y preparación de las placas.

Al trabajar con *Bacillus subtilis*, se comenzó con ampollas de esporas que contenían una concentración inicial de $2,5 \times 10^8$ esporas/ml., las que se sometieron a una serie de diluciones hasta obtener una concentración final de 3.000 esporas/ml. de agar. La misma metodología se empleó con *Bacillus cereus*, pero en este caso la concentración inicial fue de $2,5 \times 10^7$ esporas/ml.

Para *Sarcinea lutea*, se comenzó con una concentración de $1,5 \times 10^8$ bacterias/ml., alcanzando una concentración final de 350.000 bacterias/ml. de agar.

En cada placa Petri se colocó, aproximadamente, 20 ml. del medio de cultivo estéril, previamente homogeneizado con las concentraciones de bacterias o esporas mencionadas. Posteriormente se dejaron solidificar a temperatura ambiente, sobre una superficie llana.

2.3.2. Colocación de la muestra y lectura de los resultados.

Sobre el medio agar de cada placa, se colocaron cilindros de acero (de $6 \pm 0,1$ mm. de diámetro interior; $8 \pm 0,1$ mm. de diámetro exterior y 10 mm. de altura), en cuyo interior se depositaron 200 μ l. (0,2 ml.) de cada muestra.

En cada placa se incluyó un sensidisco específico, con una concentración conocida de cierto antimicrobiano, constituyendo el control positivo de la placa.

Cada placa fue incubada durante 24 horas a una temperatura que favoreció el crecimiento de la bacteria, cuyas colonias, normalmente, se desarrollaron en forma homogénea en el medio agar. Esta temperatura fue de 37°C para *Sarcinea lutea* y *Bacillus subtilis*, en los medios para β -lactámicos, aminoglucósidos y quinolonas, y de 30°C para *Bacillus cereus*, en el medio adecuado para detectar tetraciclinas.

El efecto inhibitorio sobre el crecimiento de la bacteria, originado por la presencia de residuos de un antimicrobiano en la muestra de leche, se manifestó como un círculo transparente o halo de inhibición alrededor de la zona donde fue puesto el cilindro, considerándose un resultado positivo cuando este halo sobrepasó los 12 mm. de diámetro total (equivalente a 2 mm. más allá del borde externo del cilindro).

El método contempló el ensayo en duplicado de cada muestra en un conjunto de 4 placas, las que se diferenciaron por la bacteria introducida, la composición del medio, el pH y la temperatura de incubación. Así, cada placa fue capaz de detectar un espectro diferente de antimicrobianos, abarcando, la suma de las placas, una amplia variedad de estos fármacos.

2.4. Método Delvotest SP (Gist Brocades®, Holanda).

Para la ejecución de este método microbiológico se siguieron las instrucciones del fabricante (Gist Brocades®, Holanda), las que se muestran en el anexo 1-B.

El medio de cultivo agar contiene esporas de *Bacillus stearothermophilus*, var. *calidolactis*, las que sólo germinan al adicionar una tableta nutriente (suministrada por el fabricante) e incubar a $64 \pm 0,5^\circ\text{C}$. El desarrollo de esta bacteria normalmente se manifiesta con la producción de ácido láctico, causando un viraje de color en el indicador de pH (púrpura de bromocresol) y tornando el agar a un color amarillo, luego de tres horas de incubación. Así, la permanencia del color púrpura se interpreta como la presencia de inhibidores en la muestra.

Se incluyó para cada grupo de ampollas en incubación un control negativo y un control positivo, suministrados por el fabricante.

2.5. Método Delvotest X-PRESS β L-II (Gist Brocades®, Holanda).

Este ensayo de receptor enzimático, específico para β -lactámicos, se llevó a cabo de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Gist Brocades®, Holanda), las que se muestran en el anexo 2.

El método emplea tubos de vidrio previamente recubiertos con residuos β -lactámicos especiales, en cada uno de los cuales se adicionan 200 μl . de la muestra de leche y 200 μl . de un reactivo marcado que reconoce y se une al grupo β -lactámico en penicilinas y cefalosporinas. Este reactivo marcado está constituido por una enzima (peroxidasa de rábano), ligada a una proteína aislada de *Bacillus stearothermophilus* que ofrece un sitio de unión específico para el grupo β -lactámico.

Los tubos, inmediatamente luego de agregar la muestra y el reactivo marcado, son sometidos a agitación durante 3 minutos, a 64°C. Si la muestra se encuentra libre de residuos β -lactámicos, el marcador es capturado por la molécula β -lactámica adherida al tubo, pero si la muestra contiene estos residuos, el marcador se une a ellos, formando un complejo que queda suspendido.

Luego de enjuagar y remover el marcador libre suspendido mediante una solución especial de lavado, se agrega a cada tubo 1 ml. de un sustrato enzimático que se une a la peroxidasa, desarrollando una coloración azulada (longitud de onda de 660 nanómetros). Los tubos vuelven a ser agitados por 3 minutos, pero esta vez a temperatura ambiente.

Al finalizar, los resultados son inmediatamente leídos por la Incubadora-Agitadora Delvotest X-PRESS β L-II, la que automáticamente realiza el recuento del reactivo marcado remanente (unido al tubo), mediante la comparación de la densidad óptica de cada tubo muestral con los controles. De esta forma, a menor marcador contado, mayor concentración del grupo β -lactámico en la muestra y vice-versa.

2.6. Métodos Snap β -Lactámico, Snap Tetraciclina, Cite Sulfa Trio y Cite Probe Gentamicina (IDEXX®, USA).

Para la ejecución de los ensayos se siguieron las instrucciones del fabricante.

Estos métodos corresponden a ensayos inmuno-enzimáticos competitivos en fase sólida, basados en los principios del ELISA (“enzyme-linked immunosorbent assay”). Esencialmente, el residuo contenido en la muestra compite con un residuo marcado enzimáticamente por los sitios activos que ofrecen anticuerpos adheridos a una membrana especial de papel filtro. El residuo marcado unido al sitio activo reacciona con un sustrato específico, el que es liberado en la segunda parte de la reacción, desarrollando un color cuya intensidad es inversamente proporcional a la concentración de residuos de antimicrobianos en la muestra.

Luego de algunos minutos, esta coloración es comparada con el color de un punto control, permitiendo definir una muestra positiva cuando su coloración es menor que la del control, ya que equivale a la menor unión del residuo marcado y, por lo tanto, mayor presencia de antimicrobiano en la muestra de leche.

El fabricante provee un lector colorimétrico (“Snap Image Reader”), para una mayor exactitud de los resultados.

2.7. Sensibilidad de los métodos de “screening”.

La sensibilidad o límite de detección del método de Cilindros en Placa fue previamente calculado con referencia en el modelo incorporado en el método de la A.O.A.C. (1995), el cual construye una línea de respuesta en base a un análisis de regresión entre el *log* de la concentración de determinado antimicrobiano y el ancho radial del halo de inhibición.

La sensibilidad descrita para los métodos rápidos corresponde a la entregada por los fabricantes (Gist Brocades®, Holanda; IDEXX®, USA). Algunas variaciones apreciadas por el “Food and Drug Administration” (FDA, 1998), son mencionadas entre paréntesis.

2.7.1. Tabla 2 – Sensibilidad del método de Cilindros en Placa.

| Placa | Antimicrobiano | Sensibilidad (ppb) |
|------------------------|------------------|--------------------|
| β-Lactámicos | Penicilina | 5 |
| | Ampicilina | 22 |
| | Cloxacilina | 39 |
| | Nafcilina | 15 |
| | Cefquinoma | 15 |
| | Cefoperazona | 11 |
| Tetraciclinas | Clortetraciclina | 50 |
| | Tetraciclina | 50 |
| | Oxitetraciclina | 50 |
| Aminoglucósidos | Gentamicina | 63 |
| | Neomicina | 1250 |
| Quinolonas | Enrofloxacino | 26-29 |

2.7.2. **Tabla 3 – Sensibilidad del método Delvotest SP (Gist Brocades®).**

| Antimicrobiano | Sensibilidad (ppb) |
|----------------------|--------------------|
| β-Lactámicos | |
| Penicilina–G | 2,5 (2,7) |
| Cloxacilina | 20-25 (33) |
| Dicloxacilina | 10-15 |
| Ampicilina | 3-5 (7,9) |
| Amoxicilina | 3-5 (6) |
| Oxacilina | 10 |
| Nafcilina | 10 |
| Ceftiofur | 50-70 |
| Cefapirina | 5-10 (7,7) |
| Cefalonium | 15-25 |
| Cefalexina | 60-100 |
| Cefacetil | 20-40 |
| Cefoperazona | 60-100 |
| Cefquinoma | 100 |
| Cefazolina | 10 |
| Lincosamidas | |
| Lincomicina | 300-400 |
| Tetraciclinas | |
| Tetraciclina | 300-600 |
| Oxitetraciclina | 400-500 (200) |
| Doxiciclina | 100 |
| Clortetraciclina | 300-600 |

| Antimicrobiano | Sensibilidad (ppb) |
|------------------------|--------------------|
| Macrólidos | |
| Tilosina | 100 |
| Eritromicina | 250 (400) |
| Espiramicina | 350-750 |
| Pirlimicina | 50-200 |
| Tilmicosina | 100 |
| Aminoglucósidos | |
| Gentamicina | 400-500 |
| Neomicina | 400-2000 |
| Dh–estreptomicina | 2500-10000 |
| Kanamicina | 7500 |
| Espectinomicina | 2500 |
| Quinolonas | |
| Enrofloxacino | 1000-1500 |
| Danofloxacino | 1000-1500 |
| Difloxacino | 1000-1500 |
| Morbofloxacino | 1000-1500 |
| Sulfonamidas | |
| Sulfametacina | 100-200 (500) |
| Sulfadimetoxina | 100 |
| Sulfatiazol | 100-150 (100) |
| Sulfadiazina | 100 |
| Otros | |
| Cloramfenicol | 7500-10000 |
| Dapsona | 4-8 |
| Trimetoprima | 500 |

2.7.3. **Tabla 4 – Sensibilidad del método Delvotest X–PRESS β L-II (Gist Brocades®).**

| Antimicrobiano | Sensibilidad (ppb) | Antimicrobiano | Sensibilidad (ppb) |
|---------------------|--------------------|----------------|--------------------|
| Penicilina–G | 2-4 (4,7) | Ceftiofur | 4-8 (11,5) |
| Ampicilina | 4-8 (7) | Cefquinoma | 5-20 |
| Amoxicilina | 4-8 (9,2) | Cefadroxilo | 5-25 |
| Cloxacilina | 30-60 (50) | Cefotaxime | 4-5 |
| Dicloxacilina | 25-50 | Cefoperazona | 5-20 |
| Oxacilina | 25-50 | Cefalexina | 25-50 |
| Penicilina Procaína | 3-5 | Cefalonium | 3-4 |
| Hetacilina | 6-10 | Cefapirina | 4-8 (4,1) |
| Penicilina–V | 3-5 | Cefradina | 25-50 |
| Piperacilina | 5-10 | Cefuroxime | 4-20 |
| Ticarcilina | 30-100 | Cefoxazol | 75-100 |
| Meticilina | 10-20 | | |

2.7.4. **Tabla 5 – Sensibilidad de los métodos Snap β –Lactámico, Snap Tetraciclinas, Cite Sulfa Trio y Cite Probe Gentamicina (IDEXX®).**

| Método | Antimicrobiano | Sensibilidad (ppb) |
|--|------------------|--------------------|
| Snap β–Lactámico | Penicilina–G | 3,4-3,5 |
| | Ampicilina | 8,2 |
| | Amoxicilina | 8-9,4 |
| | Ticarcilina | 50 |
| | Cloxacilina | 50 |
| | Dicloxacilina | 50 |
| | Cefadroxilo | 50 |
| | Ceftiofur | 9,6-10,5 |
| | Cefapirina | 3-3,5 |
| Snap Tetraciclinas | Oxitetraciclina | 30 |
| | Tetraciclina | 20 |
| | Clortetraciclina | 30 |
| Cite Probe Gentamicina | Gentamicina | 30 |
| Cite Sulfa Trio | Sulfatiazol | 10 |
| | Sulfametacina | 10 |
| | Sulfadimetoxina | 10 |

RESULTADOS

Se realizó el “screening” de 309 muestras de leche (150 de leche en polvo y 159 de leche fluida procesada), mediante 2 métodos microbiológicos: el método de Cilindros en Placa y Delvotest SP. Los resultados se muestran en Tabla I.

Tabla I
“Screening” microbiológico de 309 muestras de leche bovina procesada,
mediante el método de Cilindros en Placa y el método Delvotest SP.

| N = 309 | MÉTODO DE CILINDROS EN PLACA | | | | Delvotest SP | TOTAL |
|-----------------------------|------------------------------|---------------------|-----------------|---------------|--------------|-----------|
| | Quinolonas | β -Lactámicos | Aminoglucósidos | Tetraciclinas | | |
| Muestras positivas | 0 | 7 | 0 | 0 | 21 | 28 |
| Muestras sospechosas | 0 | 2 | 4 | 0 | 20 | 26 |

Veintiocho muestras, correspondientes a un 9,06%, resultaron positivas al “screening” microbiológico; 7 de éstas se definieron en la placa para β -lactámicos del método de Cilindros en Placa y 21, en Delvotest SP.

Veintiséis muestras, correspondientes a un 8,41%, resultaron sospechosas al “screening”. Entre éstas, 6 originaron un halo de inhibición en el método de Cilindros en Placa (2 en la placa destinada a β -lactámicos y 4 en la placa para aminoglucósidos), pero este halo fue inferior a los 12 mm. Las restante 20 muestras sospechosas presentaron una coloración intermedia en Delvotest SP.

Una de las muestras sospechosas al medio para β -Lactámicos (muestra N^o9) coincidió con un resultado positivo de Delvotest SP. No hubo más coincidencias entre ambos métodos microbiológicos. Los medios para quinolonas y tetraciclinas del método de Cilindros en Placa, fueron negativos para todas las muestras.

Así, el “screening” microbiológico acusó 53 muestras (equivalentes a un 17,15%) con indicios de contaminación por inhibidores, todas la cuales fueron analizadas mediante los métodos inmuno-enzimáticos Snap β -Lactámico, Snap Tetraciclinas, Cite Probe Gentamicina y Cite Sulfa Trio.

La Tabla II–A y la Tabla II–B detallan el resultado de ambas fases, además del número asignado para la individualización de las muestras durante el estudio. Las muestras de leche en polvo fueron numeradas consecutivamente del 1 al 150, mientras que la leche fluida corresponde a la numeración del 151 al 309. Se omitieron los medios para quinolonas y tetraciclinas del método de Cilindros en Placa, debido a que todas las muestras presentaron resultados negativos.

Tabla II-A

Análisis de las muestras de leche en polvo positivas y sospechosas en la primera fase, mediante métodos inmuno-enzimáticos.

| N = 150 Muestra N° | Primera Fase | | | Segunda fase | | | |
|------------------------------|-------------------|--------------------|-----------------|-------------------|-------------------|--------------------|--------------------------|
| | Medio β-Lactam | Medio Aminogluc | Delvotest SP | Snap β -Lactam | Snap Tetracicl | Cite Sulfa Trio | Cite Probe Gentamicin |
| 1 | N | N | P | N | N | N | N |
| 8 | S | N | N | N | N | N | N |
| 9 | S | N | P | P | N | N | N |
| 10 | N | N | S | N | N | N | N |
| 11 | N | N | S | N | N | N | N |
| 12 | N | N | S | N | N | N | N |
| 14 | N | N | S | N | N | N | N |
| 16 | N | N | P | N | N | N | N |
| 19 | N | N | S | N | N | N | N |
| 22 | N | S | N | P | N | N | N |
| 23 | N | S | N | N | N | N | N |
| 24 | N | S | N | N | N | N | N |
| 28 | N | N | P | N | N | N | N |
| 29 | N | N | S | N | N | N | N |
| 31 | N | N | S | N | N | N | N |
| 32 | N | N | S | N | N | N | N |
| 41 | N | N | S | P | N | N | N |
| 42 | N | N | P | N | N | N | N |
| 48 | N | N | S | N | N | N | N |
| 70 | N | S | N | P | N | N | N |
| 78 | N | N | S | N | N | N | N |
| 80 | N | N | S | N | N | N | N |
| 81 | N | N | S | N | N | N | N |
| 83 | N | N | P | P | N | N | P |
| 95 | N | N | S | N | N | N | N |
| 98 | N | N | P | P | N | N | N |
| 104 | N | N | P | P | N | N | N |
| 111 | N | N | P | P | N | N | N |
| 118 | N | N | S | N | N | N | N |
| 131 | N | N | P | P | N | N | N |
| 147 | N | N | P | N | N | N | N |
| 148 | N | N | P | P | N | N | N |
| 149 | N | N | P | P | N | N | N |
| Total Analizadas | 150 | 150 | 150 | 33 | 33 | 33 | 33 |
| Total sospechosas | 2 | 4 | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Total positivas | 0 | 0 | 13 | 11 | 0 | 0 | 1 |

(**P** → positiva; **S** → sospechosa; **N** → negativa).

Tabla II – B

Análisis de las muestras de leche fluida positivas y sospechosas en la primera fase, mediante métodos inmuno–enzimáticos.

| Muestra N° | Primera Fase | | | Segunda fase | | | |
|--------------------------|-----------------------|-----------------|--------------|----------------------|----------------|-----------------|-----------------------|
| | Medio β -Lactam | Medio Aminogluc | Delvotest SP | Snap β -Lactam | Snap Tetracicl | Cite Sulfa Trio | Cite Probe Gentamicin |
| 166 | P | N | N | P | N | N | N |
| 168 | N | N | S | N | N | N | N |
| 183 | N | N | S | N | N | N | N |
| 187 | N | N | S | N | N | N | N |
| 224 | N | N | P | N | N | N | N |
| 225 | P | N | N | P | N | N | N |
| 232 | N | N | P | N | N | N | N |
| 235 | N | N | S | N | N | N | N |
| 250 | P | N | N | N | N | N | N |
| 251 | P | N | N | N | N | N | N |
| 252 | P | N | N | N | N | N | N |
| 254 | N | N | P | N | N | N | N |
| 257 | N | N | P | N | N | N | N |
| 271 | N | N | P | N | N | N | N |
| 301 | N | N | P | N | N | N | N |
| 302 | N | N | P | N | N | N | N |
| 303 | N | N | P | N | N | N | N |
| 304 | P | N | N | P | N | N | N |
| 305 | P | N | N | P | N | N | N |
| 306 | N | N | S | N | N | P | N |
| Total Analizadas | 159 | 159 | 159 | 20 | 20 | 20 | 20 |
| Total sospechosas | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Total positivas | 7 | 0 | 8 | 4 | 0 | 1 | 0 |

(P → positiva; S → sospechosa; N → negativa).

Entre las 53 muestras analizadas con los métodos inmuno–enzimáticos, provenientes de resultados positivos y sospechosos al “screening” microbiológico, se obtuvo 16 resultados positivos (5,17%). Estas muestras correspondieron a 12 que previamente fueron positivas y a 4 que resultaron sospechosas.

Quince muestras fueron positivas a Snap β -Lactámico. Entre éstas, la muestra N° 83, que antes fue positiva a Delvotest SP, también fue positiva a Cite Probe Gentamicina.

Una muestra (N°306), sospechosa en la primera fase, resultó positiva a Cite Sulfa Trio.

Treinta y siete muestras (11,97%), correspondientes a 16 positivas y 21 sospechosas en la primera fase, encontraron resultados negativos para los cuatro métodos inmuno-enzimáticos.

Paralelamente al análisis microbiológico, todas las muestras de leche fluida fueron examinadas mediante Delvotest X-PRESS β L-II. Este ensayo de receptor enzimático, específico para β -lactámicos, originó 31 muestras positivas entre las 159 analizadas. Sólo una de éstas (muestra N°232) coincidió con un resultado positivo en el “screening” microbiológico (Delvotest SP), tal como se muestra en la Tabla II-B. Estas 31 muestras fueron luego examinadas mediante Snap β -Lactámico, resultando negativas en su totalidad, como se aprecia en la Tabla III.

Tabla III
Muestras de leche fluida positivas a Delvotest X-PRESS β L-II
y su análisis mediante Snap β -Lactámico.

| Muestra N° | Delvotest X-PRESS | Snap β -Lactam | Muestra N° | Delvotest X-PRESS | Snap β -Lactam |
|------------|-------------------|----------------------|------------------|-------------------|----------------------|
| 156 | P | N | 222 | P | N |
| 158 | P | N | 227 | P | N |
| 159 | P | N | 230 | P | N |
| 160 | P | N | 232 | P | N |
| 163 | P | N | 246 | P | N |
| 164 | P | N | 248 | P | N |
| 172 | P | N | 249 | P | N |
| 174 | P | N | 253 | P | N |
| 175 | P | N | 272 | P | N |
| 177 | P | N | 273 | P | N |
| 178 | P | N | 275 | P | N |
| 179 | P | N | 276 | P | N |
| 204 | P | N | 277 | P | N |
| 205 | P | N | 283 | P | N |
| 216 | P | N | Total Analizadas | 159 | 31 |
| 217 | P | N | Total Positivas | 31 | 0 |
| 221 | P | N | | | |

Resultados Generales.

En el “screening” microbiológico realizado a 309 muestras de leche (150 en polvo y 159 fluida), se originaron 28 (9,06%) positivas y 26 (8,41%) sospechosas. Entre las muestras positivas, se definieron 7 en la placa para β -lactámicos del método de Cilindros en Placa y 21 en Delvotest SP. Las muestras sospechosas correspondieron a 20 que presentaron una coloración intermedia en Delvotest SP y a 6 con un halo de inhibición menor a 12 mm., en el método de Cilindros en Placa (2 en la placa para β -lactámicos y 4 en la placa adecuada a aminoglucósidos). Una de estas últimas muestras, sospechosa en la placa para β -lactámicos, coincidió con un resultado positivo de Delvotest SP (muestra N°9).

Las 53 muestras (17,15%) con indicios de contaminación por antimicrobianos en el “screening” microbiológico, fueron analizadas mediante ensayos inmuno-enzimáticos específicos para la detección de β -lactámicos, tetraciclinas, sulfonamidas y gentamicina. Estos ensayos obtuvieron 16 resultados positivos (5,17%), coincidiendo con 12 positivas y con 4 sospechosas en el “screening”. 15 muestras fueron positivas a Snap β -Lactámico y, entre éstas, una muestra fue positiva además a Cite Probe Gentamicina. Una muestra (N°306), previamente sospechosa a Delvotest SP, resultó positiva con Cite Sulfa Trio. Snap Tetraciclina, también aplicado a las 53 muestras, resultó negativo en todas las muestras para los tres antimicrobianos a los que es sensible.

Paralelamente, el método de receptor enzimático, específico para β -lactámicos, Delvotest X-PRESS β L-II, originó 31 positivas entre las 159 muestras de leche fluida, correspondiendo a un 19,5% de las muestras analizadas, aunque a un 10,03% del total. Una de éstas (muestra N°232) coincidió en su resultado positivo con el método microbiológico Delvotest SP, empleado en la primera fase. Estas muestras positivas fueron, adicionalmente, sometidas al análisis de Snap β -Lactámico, el cual arrojó resultados negativos para las 31 muestras ensayadas.

En resumen, 83 muestras (26,86%) presentaron indicios de contaminación por antimicrobianos. Entre éstas, 21 muestras (6,8%) fueron sólo sospechosas y 62 muestras (20,06%) resultaron positivas, entre las cuales 49 (15,86%) resultaron positivas a un método (15 a un microbiológico y 34 a un inmuno–enzimático), mientras que 13 muestras (4,2%) presentaron resultados positivos al “screening” microbiológico y confirmados inmuno–enzimáticamente.

Tres de las 15 muestras positivas únicamente al “screening” microbiológico se originaron en el medio para β –lactámicos del método de Cilindros en Placa, mientras que las demás muestras se determinaron en Delvotest SP.

De las 34 muestras positivas únicamente a un método inmuno–enzimático, 30 se definieron en Delvotest X–PRESS β L-II, mientras que las otras cuatro correspondieron a muestras sospechosas al “screening”, de las cuales 3 fueron confirmadas por Snap β –Lactámico y una (muestra N°306) fue positiva con Cite Sulfa Trio.

Doce muestras, correspondiendo al 3,88% del total, fueron positivas a dos métodos; 4 al medio para β –lactámicos (método de Cilindros en Placa) y a Snap β –Lactámico, 7 a Delvotest SP y a Snap β –Lactámico y 1 a Delvotest SP y Delvotest X–PRESS β L-II.

Una muestra (N°83), correspondiendo al 0,32%, resultó positiva a tres métodos: Delvotest SP, Snap β –Lactámico y Cite Probe Gentamicina.

Finalmente, 226 muestras (73,14%) resultaron negativas al “screening” microbiológico, de las cuales 109 (muestras de leche fluida) también fueron negativas al análisis de Delvotest X–PRESS β L-II.

DISCUSIÓN

Desde hace más de medio siglo, los antimicrobianos han sido pieza clave para preservar la salud y la productividad en los rebaños lecheros, pero la presencia de sus residuos en la leche puede causar daño al consumidor e interferir con los procesos de elaboración de productos lácteos. Por esto, sobre la base de las propiedades toxicológicas de estos residuos, se han establecido límites máximos de residuos (LMR) en alimentos, los que representan límites superiores seguros, compatibles con la ausencia de riesgo para la salud humana o, si ésta no se encuentra en riesgo, se han determinado niveles que sean indicativos de la aplicación de buenas prácticas agrícolas.

Actualmente, la globalización de la economía ha relegado a un lugar secundario la “barrera arancelaria”, impulsando el intercambio comercial, situación que dada la eficiencia de algunos países como el nuestro en el caso de los productos de origen animal, incentiva hacia la exportación. Sin embargo, es necesario superar una nueva y significativa valla: la “barrera sanitaria”, la cual se instaura como factor de protección de la salud poblacional. Por ello, los países importadores han desarrollado políticas o normas simples que impiden el ingreso de leche o derivados lácteos que contienen residuos de sustancias químicas en concentraciones que superan la condición de inocuidad (Booth y Harding, 1986).

Sin duda, adaptarse a esta realidad implica incorporar un control más exigente, acorde con las normativas internacionales, a fin de ser competitivo en los mercados exteriores. Consciente de esta situación, en Agosto de 1999 el Ministerio de Salud de Chile (Min.Sal.) estableció LMR para los antimicrobianos más utilizados en el ganado lechero, los cuales se muestran en las tablas A y B, en paralelo con los LMR sugeridos por el Codex Alimentarius (1993), la Comunidad Económica Europea (EMEA, 1990) y el “Food and Drug Administration” (FDA, 1991).

TABLA A
Límites Máximos de Residuos (ppb) para Antimicrobianos en Leche.
(Codex Alimentarius, Unión Europea, FDA y Ministerio de Salud de Chile)

| Antimicrobiano | LMR Codex | LMR EMEA | LMR FDA | LMR Min. Sal. |
|-----------------------|----------------------|---------------------|--------------------|--------------------------|
| β-Lactámicos | | | | |
| Penicilina | 4 | 4 | 5 | 4 |
| Ampicilina | – | 4 | 10 | 4 |
| Amoxicilina | – | 4 | 10 | 4 |
| Nafcilina | – | 30 | – | – |
| Cloxacilina | – | 30 | 10 | 30 |
| Dicloxacilina | – | 30 | – | – |
| Oxacilina | – | 30 | – | 30 |
| Cefacetil | – | 125 | – | – |
| Ceftiofur | 100 | 100 | 50 | 100 |
| Cefapirina | – | 10 | 20 | 20 |
| Cefazolina | – | 50 | – | 50 |
| Cefquinoma | – | 20 | – | 20 |
| Cefalexina | – | 100 | – | – |
| Cefalonium | – | 10 | – | – |
| Tetraciclinas | | | | |
| Clortetraciclina | 100 | 100 | 30 | 100 |
| Doxiciclina | – | 0 | – | – |
| Oxitetraciclina | 100 | 100 | 30 | 100 |
| Tetraciclina | 100 | 100 | 80 | 100 |
| Sulfonamidas | | | | |
| Sulfadimidina | 25* | 100* | 10 | 25* |
| Sulfadimetoxina | 25* | 100* | 10 | 25* |
| Sulfamerazina | 25* | 100* | 10 | 25* |
| Sulfatiazol | 25* | 100* | 10 | 25* |
| Sulfadiazina | 25* | 100* | 10 | 25* |
| Sulfametacina | 25* | 100* | 10 | 25* |
| Sulfamethizole | 25* | 100* | 10 | 25* |
| Sulfanilamida | 25* | 100* | 10 | 25* |
| Sulfapiridina | 25* | 100* | 10 | 25* |
| Sulfaquinoxalina | 25* | 100* | 10 | 25* |

Nota: El símbolo “*” indica que la suma de sulfonamidas no debe superar este LMR. El símbolo “–” indica que el LMR aún no ha sido establecido.

TABLA B
Límites Máximos de Residuos (ppb) para Antimicrobianos en Leche.
(Codex Alimentarius, Unión Europea, FDA y Ministerio de Salud de Chile)

| Antimicrobiano | LMR Codex | LMR EMEA | LMR FDA | LMR Min. Sal. |
|------------------------|-----------|----------|---------|---------------|
| Macrólidos | | | | |
| Eritromicina | – | 40 | 50 | 40 |
| Espiramicina | 100 | 200 | – | 200 |
| Tilmicosina | 50 | 50 | – | – |
| Tilosina | – | 50 | 50 | – |
| Pirlimicina | – | 150 | – | – |
| Aminoglucósidos | | | | |
| Neomicina | 500 | 500 | 150 | 500 |
| Espectinomicina | 200 | 200 | 30 | 200 |
| Dh–estreptomicina | 200 | 200 | 125 | 200 |
| Gentamicina | 200 | 100 | 30 | 200 |
| Quinolonas | | | | |
| Danofloxacino | – | 30 | – | – |
| Marbofloxacino | – | 75 | – | – |
| Difloxacino | – | 0 | – | – |
| Flumequina | – | 0 | – | – |
| Enrofloxacino | – | 100 | – | 100 |
| Otros | | | | |
| Baquiloprima | – | 30 | – | – |
| Cloramfenicol | – | 0 | 0 | 0 |
| Ácido clavulánico | – | 200 | – | – |
| Colistina | – | 50 | – | 50 |
| Dapsone | – | 0 | – | – |
| Lincomicina | – | 150 | – | – |
| Novobiocina | – | 50 | 100 | – |
| Rifaximin | – | 60 | – | – |
| Tiamfenicol | – | 50 | – | – |
| Trimetoprima | – | 50 | – | 50 |
| Bacitracina | – | 150 | – | 500 |

Nota: El símbolo “–” indica que el LMR aún no ha sido establecido.

A continuación, la tabla C compara la sensibilidad de los métodos empleados en este estudio (punto 2.7 del Método) frente al LMR establecido por el Ministerio de Salud de Chile (Min.Sal.).

Tabla C
Comparación de los LMR (ppb) establecidos por el Min.Sal. (1999)
con la sensibilidad (ppb) de los métodos de “screening”.

| Antimicrobiano | LMR Min.Sal. | Cilindros en Placa | Delvotest SP® | Delvotest X-PRESS® | Inmunoensayos IDEXX® |
|-----------------------|---------------------|---------------------------|----------------------|---------------------------|-----------------------------|
| Penicilina | 4 | 5 | 2,5 (2,7) | 2-4 (4,7) | 3,4-3,5 |
| Ampicilina | 4 | 22 | 3-5 (7,9) | 4-8 (7) | 8,2 |
| Amoxicilina | 4 | – | 3-5 (6) | 4-8 (9,2) | 8-9,4 |
| Cloxacilina | 30 | 39 | 20-25 (33) | 30-50 (60) | 50 |
| Oxacilina | 30 | – | 10 | 25-50 | – |
| Ceftiofur | 100 | – | 50-70 | 4-8 (11,5) | 9,6-10,5 |
| Cefapirina | 20 | – | 5-10 (7,7) | 4-8 (4,1) | 3-3,5 |
| Cefquinoma | 20 | 15 | 100 | 5-20 | – |
| Cefazolina | 50 | – | 10 | – | – |
| Clortetraciclina | 100 | 50 | 300-600 | – | 30 |
| Oxitetraciclina | 100 | 50 | 400-500 (200) | – | 30 |
| Tetraciclina | 100 | 50 | 300-600 | – | 20 |
| Sulfametacina | 25 (total) | – | 100-200 (500) | – | 10 |
| Sulfadimetoxina | 25 (total) | – | 100 | – | 10 |
| Sulfatiazol | 25 (total) | – | 100-150 (100) | – | 10 |
| Sulfadiazina | 25 (total) | – | 100 | – | – |
| Eritromicina | 40 | – | 250 (400) | – | – |
| Espiramicina | 200 | – | 350-750 | – | – |
| Neomicina | 500 | 1250 | 400-2000 | – | – |
| Espectinomicina | 200 | – | 2500 | – | – |
| Dh-Estreptomicina | 200 | – | 2500-10000 | – | – |
| Gentamicina | 200 | 63 | 400-500 | – | 30 |
| Enrofloxacino | 100 | 29 | 1000-1500 | – | – |
| Bacitracina | 500 | – | – | – | – |
| Cloranfenicol | 0 | – | 7500-10000 | – | – |
| Colistina | 50 | – | – | – | – |
| Trimetoprima | 50 | – | 500 | – | – |

Nota: Los valores de sensibilidad sin paréntesis son proporcionados por los fabricantes de los ensayos; los entre paréntesis provienen de estudios realizados por el FDA (1998).

De los 24 antimicrobianos con LMR establecido por el Ministerio de Salud de Chile (1999), 15 habrían sido bien detectados por el “screening” microbiológico, según la sensibilidad entregada por los fabricantes de los métodos empleados, aunque para 3 de éstos el FDA observó una sensibilidad superior al LMR, en Delvotest SP. Por otra parte, para 8 antimicrobianos la sensibilidad de los métodos habría sido insuficiente para detectarlos a la concentración LMR del Min.Sal. y, entre éstos, bacitracina y colistina no habrían sido detectados en lo absoluto. Las sulfonamidas no habrían presentado una adecuada sensibilidad al “screening” microbiológico y sólo tres de ellas habrían sido detectadas a la concentración LMR con Cite Sulfa Trio, ensayo utilizado en la segunda fase a un menor número de muestras.

Siguiendo la metodología de control de residuos de antimicrobianos propuesta por la Comisión del Codex Alimentarius (1994), en esta investigación las muestras de leche fueron sometidas al análisis de 2 tipos de métodos; primero uno con alta sensibilidad y amplio espectro, como los microbiológicos, y luego uno más específico, de carácter inmunológico o enzimático.

Debido a que el objetivo de esta tesis se refirió a una prospección hacia la producción lechera nacional, no se analizaron los resultados en relación al tipo de leche, contenido de materia grasa, ni planta de origen, respetando la integridad de imagen de las plantas lecheras que, voluntariamente, formaron parte de este estudio.

Se analizaron 309 muestras de leche (150 en polvo y 159 fluida), elaboradas por las principales plantas lecheras de Chile, mediante los métodos microbiológicos Delvotest SP y el método de Cilindros en Placa.

El “screening” microbiológico originó 53 muestras (17,15%) con indicios de contaminación por antimicrobianos, las cuales se sometieron al análisis de Snap β -Lactámico, Snap Tetraciclinas, Cite Probe Gentamicina y Cite Sulfa Trio. Estos ensayos inmuno-enzimáticos confirmaron la presencia de residuos de antimicrobianos en 16 muestras (5,17%).

Paralelamente al “screening”, las 159 muestras de leche fluida fueron analizadas por Delvotest X–PRESS β L-II, el cual originó 31 muestras positivas, equivalentes a un 19,5% de las muestras analizadas (10,03% del total). Una muestra coincidió con Delvotest SP. Todas estas muestras positivas se analizaron con Snap β –Lactámico.

Las muestras de leche en polvo no pudieron ser analizadas por Delvotest X–PRESS β L-II, debido a una restricción técnica del fabricante. Sin embargo, puede suponerse que no existiría una diferencia significativa de este 19,5% de muestras positivas encontrado en la leche fluida.

Entonces, 83 de las 309 muestras analizadas (26,86%) presentaron resultados compatibles con la presencia de residuos de antimicrobianos en la leche.

La conocida sensibilidad de los métodos permite realizar una aproximación hacia los antimicrobianos que habrían generado estos resultados, análisis que a continuación se detalla.

- Veintiún muestras (6,8%) fueron únicamente sospechosas al “screening”; 18 con Delvotest SP y 3 con el método de Cilindros en Placa (una en la placa para β –lactámicos y dos en la placa para aminoglucósidos). Estas muestras habrían presentado muy bajas concentraciones de residuos de antimicrobianos, o esta leve inhibición podría haber sido generada por la presencia de otros inhibidores para los cuales los microorganismos empleados en los ensayos no fueron lo suficientemente sensibles. No puede descartarse que la inhibición del crecimiento bacteriano se deba a la presencia de desinfectantes, productos para “dipping”, ungüentos mamarios u otras sustancias inhibidoras diferentes a los antimicrobianos, originando falsos resultados positivos.
- Quince muestras (4,85%) resultaron positivas sólo al “screening”; 12 a Delvotest SP y 3 al medio para β –lactámicos del método de Cilindros en Placa. Entre los antimicrobianos con LMR del Min.Sal., cabe la posibilidad de que estas muestras contengan bajas concentraciones de penicilina, amoxicilina, cloxacilina, oxacilina, cefquinoma o cefazolina. Entre las 12 muestras positivas sólo con Delvotest SP existe la posibilidad de que se trate de sulfadiazina, estreptomina/dh–estreptomina, espectinomicina, eritromicina, espiramicina, trimetoprima y cloramfenicol, cualquiera de los cuales se habría encontrado muy por sobre el LMR.

Estos resultados también pudieron ser originados por antimicrobianos que aún no poseen un LMR, tales como dicloxacilina, lincomicina, doxiciclina, pirlimicina, tilosina y danofloxacino, entre otros.

- Tres muestras (0,97%) sospechosas al método de Cilindros en Placa, en el “screening”, pero negativas a Delvotest SP, fueron positivas con Snap β -Lactámico. Estas fueron muestras de leche en polvo, que no se sometieron al análisis de Delvotest X-PRESS β L-II. Entre los antimicrobianos con LMR del Min.Sal., es muy posible la contaminación por cefapirina o ceftiofur, los cuales también son bien detectados por Delvotest SP, por lo que en estas muestras se encontrarían a una concentración menor al LMR. También podrían corresponder a ticarcilina o cefadroxilo, antimicrobianos para los que aún no se determina LMR.
- Doce muestras (3,88%) positivas al “screening” (8 a Delvotest SP y 4 a la placa para β -lactámicos del método de Cilindros en Placa) también resultaron positivas con Snap β -Lactámico, lo que representaría contaminación por penicilina, amoxicilina, ampicilina, ceftiofur o cefapirina. Cuatro de estas muestras resultaron negativas a Delvotest X-PRESS β L-II, lo cual restringe la contaminación más probable a penicilina o amoxicilina, para estas muestras, pudiendo encontrarse sobre el LMR..

Una de estas muestras además resultó positiva con Cite Probe Gentamicina, evidenciando contaminación por más de un antimicrobiano en la muestra. Sin embargo, la adecuada sensibilidad del método de Cilindros en Placa para gentamicina permite afirmar que la concentración de esta muestra se encontró bajo el LMR del Min.Sal.

- Treinta muestras (9,71%) de leche fluida resultaron positivas solamente con Delvotest X-PRESS β L-II. Dado el amplio espectro de detección de este ensayo para residuos de β -lactámicos y considerando los resultados negativos de los demás ensayos, cabría esperar que estas muestras hayan contenido antimicrobianos que aún no poseen LMR del Min.Sal., tales como meticilina, piperacilina, hetacilina, cefotaxime, cefuroxime, cefoxazol, cefradina, cefoperazona, cefadroxilo, cefalexina o cefalonium.

- Una muestra (0,32%) de leche fluida fue positiva a Delvotest SP y también lo fue con Delvotest X-PRESS β L-II, pero resultó negativa con Snap β -Lactámico, lo que permite suponer que se trataría de la presencia de oxacilina, cefalexina o cefalonium. Cabe la posibilidad de que corresponda a la presencia conjunta de un β -lactámico diferente a los detectables por Snap β -Lactámico y, además, otro antimicrobiano detectable sólo por el amplio espectro del ensayo microbiológico.
- Una muestra (0,32%) fue sospechosa a Delvotest SP y posteriormente resultó positiva a Cite Sulfa Trio, es decir, a sulfatiazol, sulfametacina o sulfadimetoxina. Considerando la insuficiente sensibilidad de Delvotest SP para detectar sulfonamidas, esta muestra podría estar sobrepasando el LMR del Min.Sal. Sin embargo, considerando que Cite Sulfa Trio se aplicó a 53 muestras, se podría suponer que la contaminación por estas tres sulfonamidas no sería superior a un 1,89% de las muestras. Cabe mencionar que el Min.Sal. estipuló un LMR de 25 ppb para la suma de sulfonamidas en la leche, de las cuales Delvotest SP es sensible sólo a cuatro, pudiendo encontrarse resultados falsos negativos para este grupo antimicrobiano.
- Un total de 226 muestras (73,14%) (117 de leche en polvo y 109 de leche fluida) resultaron negativas al “screening” microbiológico y, además, las 109 muestras de leche fluida fueron negativas con Delvotest X-PRESS β L-II. Esto permite afirmar que estas muestras se encontrarían bajo el LMR para 15 de los 24 antimicrobianos con LMR del Min.Sal. Ocho antimicrobianos no lograron ser detectados al nivel LMR, como es el caso de eritromicina, estreptomycin/dh-estreptomycin, espiramicina, espectinomicina, bacitracina, cloramfenicol, colistina y trimetoprima. Sólo parcial fue la detección de sulfonamidas, como se discutió en el punto anterior. Además, ciertas reservas merece la situación de amoxicilina, ampicilina y cloxacilina, para los cuales Delvotest SP y Delvotest X-PRESS β L-II señalan una sensibilidad adecuada para el LMR del Min.Sal., pero el FDA (1998) indica que esta sería superior a lo indicado por el fabricante, lo que representaría resultados falsos negativos para estos antimicrobianos.

- La detección de las tetraciclinas estuvo a cargo, en la primera fase, del método de Cilindros en Placa, cuyo microorganismo (*Bacillus cereus*) sería igualmente sensible a la presencia de 50 ppb de las 3 tetraciclinas con LMR del Min.Sal., según investigaciones de Suhren y Heeschen (1993). Todas las muestras fueron negativas al “screening” y, adicionalmente, 53 muestras resultaron negativas con Snap Tetraciclina que presenta, según el fabricante, una sensibilidad adecuada al menor LMR del FDA.
- No hubo indicios de contaminación por enrofloxacino, según la adecuada sensibilidad de la placa para quinolonas del método de Cilindros en Placa.

Los métodos empleados en el esquema analítico permitieron detectar 15 de los 24 antimicrobianos con LMR del Min.Sal., mientras que únicamente 3 sulfonamidas fueron bien detectadas y sólo en la segunda fase (sobre 53 muestras).

Los resultados permiten concluir que en la leche producida en Chile se encuentran antimicrobianos por sobre el LMR del Min.Sal. Entre los contaminantes detectados predominan los antimicrobianos β -lactámicos, pudiendo encontrarse una gran proporción de cefalosporinas, la que podría ser mayor considerando que Delvotest X-PRESS β L-II no pudo ser aplicado a las muestras de leche en polvo.

Ocho antimicrobianos con LMR del Min.Sal. no encontraron una adecuada sensibilidad con ninguno de los métodos empleados en este estudio.

En Chile aún no existe una normativa respecto a la adquisición de drogas antibacterianas y tampoco está supervisada su utilización en animales productores de alimento, razón por la cual es posible encontrar una gran variedad de residuos de antimicrobianos en la leche. Esta situación hace de elección, para el “screening” de la leche, el empleo de métodos microbiológicos. Sin embargo, estos métodos pueden no presentar una sensibilidad adecuada para todos los LMR y, por otra parte, son susceptibles a originar falsos positivos, ya sea por la detección de antimicrobianos para los que aún no se determina LMR o por inhibidores diferentes a los antimicrobianos.

Las técnicas inmunológicas y enzimáticas son más específicas, pero con un reducido espectro de detección, por lo que es imprescindible el conocimiento de la sensibilidad y el espectro de antimicrobianos que detecta determinado método, con el fin de utilizar el más adecuado a la realidad del predio, lo que, obviamente, exige la mantención actualizada de un adecuado sistema de registros. Éstas técnicas son útiles en países donde son pocos los antimicrobianos aprobados para animales de abasto, reduciéndose los resultados falsos negativos.

Actualmente, los temores sobre alimentos poco saludables desde países exportadores resulta en un incremento de las restricciones del comercio internacional (Kaneene y Miller, 1997). Esta materia debe ser de especial interés para nuestro país, ya que Chile está contrayendo acuerdos comerciales con varios países desarrollados que, ciertamente, consideran a los antimicrobianos en la leche y otros alimentos de origen animal como uno de los residuos de mayor riesgo para la población consumidora.

Es de gran relevancia incentivar a las autoridades, productores y empresarios del rubro hacia la producción de una leche saludable, que sea adecuada para los requerimientos de los mercados internacionales y que siga representando aquel insustituible alimento en el cual el consumidor ha confiado desde siempre.

CONCLUSIONES

1. Se detectó contaminación por residuos de antimicrobianos tanto en leche en polvo como en leche fluida procesada.
2. La principal contaminación correspondió a residuos de β -lactámicos.
3. En una muestra se detectó la presencia de gentamicina y en otra, la presencia de sulfonamidas.
4. No hubo indicios de contaminación por residuos de quinolonas o tetraciclinas.
5. Los métodos de “screening” empleados en el esquema analítico de este estudio no permitieron detectar todos los antimicrobianos que podrían haber contaminado la leche, incluso algunos para los cuales el Ministerio de Salud de Chile estableció LMR.
6. Hasta que en Chile se supervise la distribución y el uso de antimicrobianos en el ganado lechero, el sistema de detección de estos residuos debiera ser ampliado y perfeccionado, introduciendo métodos más sensibles, más específicos y con un mayor espectro de detección.

BIBLIOGRAFÍA

Adams, J.B., 1994. Symposium: Impact of drug control measures. *J. Dairy Sci.*, 77: 1933-35.

Allison, J.R.D., 1985. Antibiotic residues in milk. *Br. Vet. J.*, 141(1): 9-16.

Anderson, K.L.; Moats, W.A.; Rushing, J.E.; Wesen, D.P.; Papich, M.G., 1996. Ampicillin and amoxicillin residue detection in milk, using receptor microbial assay (Charm II) and liquid chromatography methods, after extra-label administration of drugs to lactating cows. *Am. J. Vet. Res.*, Jan., 57(1): 73-8.

Andrew, S.M., 2000. Effect of fat and protein content of milk from individual cows on the specificity rates of antibiotic residue screening test. *J. Dairy Sci.*, 83(12): 2992-7.

Association of Official Analytical Chemist (A.O.A.C.), 1990. Official Methods of Analysis of A.O.A.C. International. *Assoc. Offic. Chem. Arlington, V.A. 14th Edition, Sections 16.130, 16.163, 36.280, 42.203, 42.204, 42.206, 42.207, 42.208.*

Bang, N.U.; Kammer, R.B., 1983. Hematologic complications associated with β -lactam antibiotics. *J. Inf. Disease*, 5(2): 380-93.

Bartlett, J.G., 1990. *Clostridium difficile*: Clinical considerations. *J. Inf. Disease*, 12: 244.

Berridge, N.J., 1956. Penicillin in milk. The rapid routine assay of low concentrations of penicillin in milk. *J. Dairy Res.*, 23: 336-41.

Bishop, J.R.; Bodine, A.B.; O'Dell, G.D.; Jansen, J.J., 1984. Retention data for antibiotics commonly used for bovine infections. *J. Dairy Sci.*, 67: 437-40.

Booth, J.M., 1982. Antibiotic residues in milk. *In Pract.*, Jul., 4(4): 100-9.

Booth, J.M., 1987. Testing milk for quality and antibiotic residues. *Vet. Rec., Aug.* 22, 121(8): 183.

Booth, J.M.; Harding, F., 1986. Testing for antibiotic residues in milk. *Vet. Rec.,* 119: 556-69.

Borges, G.T.; Santana, Â.P.; De Mesquita, A.J.; Porto, S.Q.; Da Silva, L.A.; De Queiroz, V., 2000. Ocorrência de resíduos de antibióticos em leite pasteurizado integral e padronizado produzido e comercializado no estado de Goiás. *Ciência Animal Brasileira, 1(1):* 59-63.

Brady, M.S.; Katz, S.E., 1988. Antibiotic/Antimicrobial residues in milk. *J. Food Prot., 51(1):* 8-11.

Calvin, M.K., 1985. Resistencia a los antibióticos: un problema mundial que no podemos olvidar. *Rev. Méd. de Chile, 113:* 804-5.

Calvinho, L.F., 2003. ¿Cómo producir leche sana?.

En: <<http://www.cuencarural.com.ar/lecheria/le0013.htm>>, consultado el 21/03/2003.

Carlsson, A.; Bjorck, L.; Persson, K., 1989. Lactoferrin and lisozyme in milk during acute mastitis and their effect in Delvotest P®. *J. Dairy Sci., 72(12):* 3166-75.

Casarett and Doull's, 1991. Toxicology, the basis science of poisons. *Fourth edition,* Pergamon Press, p: 371-4, 378-82, 824-6, 851-3.

Castañeda, R., 2002. Los residuos de antibióticos en la leche. Trabajo presentado en el XIX Congreso Nacional de Laticinios–15 al 19 de julio, 2002, Juiz de Fora, Brasil.

En: <http://www.publitec.com/residues_antibioticos.htm>, consultado el 24/06/2003.

Codex Alimentarius, 1993. Residues of veterinary drugs in foods. *Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO, volume 3, Second Edition, Rome.*

Codex Alimentarius, 1994. Criteria for evaluating acceptable methods for codex purposes. *Joint FAO/WHO Food Standards programme, Codex committee on methods of Analysis and Sampling: 19th session, Budapest, Hungary.*

Cullor, J.S., 1992. Test for identifying antibiotic residues in milk: How well do they work?. *Vet. Med.*, 87(12): 1235-41.

Cullor, J.S., 1993. Antibiotic residue test for mammary gland secretions. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.*, Nov., 9(3): 609-29.

Cullor, J.S., 1995. Milk antibiotic residue test and veterinary practice. *Food Animal*, 17(6): 863-70.

Cullor, J.S.; Van Eenennaam, A.; Dellinger, J., 1992. Antibiotic residue assays: can they be used for test milk from individual cows?. *Vet. Med.*, 87(5): 477-94.

Dewdney, J.M.; Edwards, R.G., 1984. In antimicrobials and agriculture. *Ed. M. Woodbine. In press.*

Egan, J.; Meaney, W.J., 1984. The inhibitory effect of mastitic milk and colostrum on test methods used for antibiotics detection. *Ir. J. Food Sci. Technol.*, 8: 115-20.

Erskine, R.J.; Wilson, R.C.; Tyler, J.W.; McClure, K.A.; Nelson, R.S.; Spears, H.J., 1995. Ceftiofur distribution in serum and milk from clinically normal cows and cows with experimentally Escherichia coli–induced mastitis. *Am. J. Vet. Res.*, 56: 481-5.

European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA), 1990. Laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. *Council Regulation N°2377, June, 1990.*

En: <http://pharmacos.endra.org/F2/endralex/vol-8/pdf/Vol8rev1Final24June2003.pdf>, consultado el 11/08/03.

Fabre, J.M.; Moretain, J.P.; Ascher, F.; Brouillet, P.; Berthelot, X., 1995. Main causes of inhibitors in milk. A survey in one thousand French dairy farms. *Proc. IDF Symposium on Residues of Antimicrobial Drugs and other Inhibitors in Milk. Kiel, Germany, 28-31 August, 1995: 27-31.*

Food and Drug Administration (FDA), 1990. Health risk assessment: Drugs residues in milk. *Memorandum, January 11.*

Food and Drug Administration (FDA), 1991. Tolerance and/or safe levels of animal drug residues in milk. *Memorandum, July 21.*

Food and Drug Administration (FDA), 1998. Codex of Federal Regulations. *Title 21, part 556.*

Gassner, B.; Wuethrich, A., 1994. Pharmacokinetic and toxicological aspects of the medication of beef-type calves with an oral formulation of chloramphenicol palmitate. *J. Vet. Pharmacol. Therap., 17: 279-83.*

Gilbert, D.N.; Sanford, J.P., 1983. A clinical perspective of antibiotic therapy: aminoglycosides vs. broad spectrum β -lactams. *J. Inf. Disease,, 5(2): 211-4.*

Goodman, L.S.; Gilman, A., 1996. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 9^a ed. Buenos Aires (Argentina), *Ed. Médica Panamericana, p: 1093-193.*

Gorbach, S.L., 1993. Perturbation of intestinal microflora. *Vet. and Human Toxicol., 35 (supp. 1): 15-23.*

Hillerton, J.E.; Halley, B.I.; Neaves, P.; Rose, M.D., 1999. Detection of antimicrobial substances in individual cow and quarter milk samples using Delvotest® microbial inhibitor test. *J. Dairy Sci., Apr., 82(4): 704-11.*

Hogg, R.A.; White, A.J.; Jackman, R., 1992. Prolonged excretion by heifers of an inappropriately used intramammary antibiotic. *Vet. Rec.*, 130: 402-3.

Huy, P.T.B.; Meulemans, A.; Wassef, M.; Sterkers, O.; Amiel, C., 1983. Gentamicin persistence in rat endolymph and perilymph after a two-day constant infusion. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 23: 344-9.

Intefarma, 1995. Acerca de las Quinolonas: mecanismo de acción. *En:* <http://www.infomed.sld.cu/revistas/sint/vol1_4_95/sint4495.htm>, consultado el 04/10/2002.

Jackman, R.; Chesham, S.J.; Dyetr, S.D., 1990. Prolonged excretion by heifers of an inappropriately used intramammary antibiotic. *J. of the Society Dairy Tech.*, 43: 93.

Kaneene, J.B.; Miller, R., 1997. Problems associated with drug residues in beef from feeds and therapy. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 16(2): 694-708.

Keukens, H.J.; Erts, M.M.; Traags, W.A., 1992. Analytical strategy for the regulatory control of residues of chloramphenicol in meat; preliminary studies in milk. *J. of A.O.A.C. Int.*, 75(2): 245-56.

Knappstein, K.; Suhren, G.; Walte, H.G.; Slaghuis, B.A.; Ferwerda-van Zonneveld, R.T., 2004. Prevention of antibiotic residues. Appropriate management of antibiotic treatment of cows in automatic milking systems. *En:* <<http://www.automaticmilking.nl>>, consultado el 15/03/2004.

Koppinen, J.; Heinonen, K., 2001. Lihakseen annetun rokaäinipenisilliinin aiheuttamat jäämät hoidettujen lehmien maidossa. *Suomen Eläinlääkärilehti*, 107: 235-9.

Kucers, A., 1980. Current position of chloramphenicol in chemotherapy. *J. Antimicrob. Chemother.*, 6: 1-9.

Langford, F.M.; Weary D.M.; Fisher, L., 2003. Antibiotic resistance in gut bacteria from dairy calves: a dose response to the level of antibiotics fed in milk. *J. Dairy Sci.*, 86(12): 3963-6.

Laurent, G.; Tulkens, P.M., 1987. Aminoglycoside nephrotoxicity: cellular and molecular aspects. *ISI Atlas Sci. Pharmacol.*, 1: 40-4.

Lehtolainen, T.; Shwimmer, A.; Shpigel, N.Y., Honkanen–Buzalski, T.; Pyorala, S., 2003. In vitro antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolates from clinical bovine mastitis in Finland and Israel. *J. Dairy Sci.*, 86(12): 3927-32.

Lietman, P.S.; Smith, C.R., 1983. Aminoglycoside nephrotoxicity in humans. *J. Inf. Disease*, 5(2): 284-92.

Macintosh, A.I., 1990. Liquid chromatographic determination of cepharin residues in milk. *J. of A.O.A.C.*, 73(6): 1205-7.

McEwen, S.A.; Black, W.D.; Meek, A.H., 1991. Antibiotic residue prevention methods, farm management and occurrence of antibiotic residues in milk. *J. Dairy Sci.*, Jul., 74(7): 2128-37.

Mellgren, C.; Sternesjö, A.; Hammer, P.; Suhren, G.; Björck, L.; Heeschen, W., 1996. Comparison of biosensor, microbiological, immunochemical and physical methods for detection of sulfamethazine residues in raw milk. *J. Food Prot.*, 59(11): 1223-6.

Mercer, H.D., 1988. Specific information regarding withholding times associated with extra label drugs uses: selective condemnation. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 192(2): 265-7.

Ministerio de Agricultura, 1996. Cloranfenicol. *Resolución exenta N°3.599, publicada en el Diario Oficial el 29 de noviembre de 1996. Servicio Agrícola Ganadero (SAG), Chile. 2p.*

Ministerio de Salud, 1999. Límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en alimentos destinados al consumo humano. *Resolución exenta N°1.462, Santiago, 25 de Agosto de 1999, publicada en el Diario Oficial el 4 de Octubre de 1999 por el Departamento de Programas sobre el Medio Ambiente, División de Salud Ambiental, Chile.* En: <http://www.tecnoalimentos.cl/html2/limites.html#arribalimites>, consultado el 27/09/02.

Moats, W.A.; Anderson, K.L.; Rushing, J.E.; Wesen, D.P., 1995. Comparison of a radioimmunoassay (Charm II) test with high-performance liquid chromatography for detection of oxytetracyclin residues in milk samples from lactation cattle. *Am. J. Vet. Res.*, 56(6): 795-800.

Moretain, J.P.; Loussouarn, S.; De Estévez, E.; Boisseau, J., 1983. Élimination des résidus d'antibiotiques dans le lait: les tétracyclines. *Rec. Méd. Vét.*, 195(5): 473-80.

Musser, J.; Anderson, K., 1999. Using drug residue screening test to investigate antibiotic contamination of milk. *Vet. Med.*, 94(5):474-9.

Nickerson, S.C., 1987. Immune mechanisms of the bovine udder. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 187: 41-5.

Norrby, S.R., 1986. Problems in evaluation of adverse reactions to β -lactam antibiotics. *J. Inf. Disease*, 8(3): 358-79.

Nouws, J.F.; Loeffen, G.; Schouten, J.; Van Egmond, H.; Keukens, H.; Stegeman, H., 1998. Testing of raw milk for tetracycline residues. *J. Dairy Sci.*, 81(9): 2341-5.

ODEPA, 1999. Boletín de la leche. *Ministerio de Agricultura, Oficina de Estudios y Políticas Agrarias.* En: <www.odepa.gob.cl>, consultado el 16/06/2001.

Okada, Y., 1986. Bacterial inhibitors in milk produced by cows treated with no antibiotics. *Jap. Vet. Med. Assoc.*, 39: 97-101.

Oliver, S.P.; Maki, J.L.; Dowlen, H.H., 1990. Antibiotic residues in milk following antimicrobial therapy during lactation. *J. Food Prot.*, 538: 693-6.

Ortega, M.E.; Arellano, L.; Morales, M., 1988. Empleo de antibióticos en alimentos para animales y sus consecuencias sobre la salud pública. *La Rev. Invest. Clin.*, 40(5): 423-31.

Pharmacia & Upjohn Company, 2001. Guía de Antibióticos para el ganadero. En: <www.PharmaciaAH.com>, consultado el 02/06/2002.

Prange, R.W.; Oliver, S.P.; DUBY, R.T.; Tritschler, T.; Bushe, T.; Lamsa, J.C., 1984. Persistence of residues in milk following antibiotic therapy during lactation. *J. Dairy Sci.*, 57, supplement 1: 173.

Prescott, J.F.; Baggot, J.D., 1988. Terapéutica antimicrobiana veterinaria. Zaragoza, 7ª ed. (España), Acribia. P: 393-8.

Rama, Y.; Ram, S.; Sanjeen, A., 1985. Diffusion test for detection of streptomycin in milk. *J. Dairy Res.*, 52: 596.

Reglamento Sanitario de los Alimentos, 1997. Decreto Supremo N°977, Ministerio de Salud, Chile. Publicado en el Diario Oficial el 13 de Mayo de 1997.

Rehm, W.G, 1986. General aspects of metabolism, residues and toxicology of sulfonamides and dihidrofolate reductase inhibitors. *Drug Res. in Animals.* Orlando, Flo., Academic Press.: 65-104.

Reina, M., 2003. Elisa. En: <www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/elisa.htm>, consultado el 15/09/2003.

Rule, R.; Quiroga, G.; Buschiazzo, H.; Lacchini, R.; Mordujovich, P., 1998. Rate of decline of cefotaxime and ceftazidime in milk following intramammary administration to healthy and mastitic dairy cows. *Vet. Rec.*, 143: 310-1.

Ryan, J.J.; Wildman, E.E.; Duthie, A.H.; Atherton, R., 1986. Detection of penicillin, cepharin and cloxacillin in comingled raw milk by the spot test. *J. Dairy Sci.*, 69: 1510-7.

San Martín, B.; Moraga, R., 1996. Evaluación de la técnica microbiológica con *Bacillus subtilis* BGA, para la identificación de residuos de antimicrobianos en leche bovina. *Av. Cs. Vet.*, 11(1): 43-8.

San Martín, B.; Rojas, V.; Orellana, C.; Pedraza, C.; Zurich, L., 1995. Evaluación de los tiempos de resguardo en la leche de vacas en lactancia de dos antibióticos de larga acción: amoxicilina L.A. y oxitetraciclina L.A. *Av. Cs. Vet.*, 10(1): 86-93.

Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), 1995. Control y registro de productos farmacéuticos de uso veterinario, Decreto Supremo N° 139, Santiago, Chile. 3 p.

Seymour, E.H.; Jones, G.M.; McGilliard, M.L., 1988. Persistence of residues in milk following antibiotic treatment of dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, Aug., 71(8): 2292-6.

Schällibaum, M., 1990. Antibiotikatherapie und Rückstände in der Anlieferungsmilch. *Swiss Vet.*, 7: 7-9.

Shitandi, A.; Kihumbu, G., 2004. Laboratory evaluation of the improved tube test detection limits for β -lactam residues in Kenya milk. *Afr. J. Biotechnol.*, 3(1): 82-7.

Shitandi, A.; Sternesjo, A., 2004. Factors contributing to the occurrence of antimicrobial drugs residues in Kenyan milk. *J. Food Prot.*, Feb., 67(2): 399-402.

Sisho, W.M.; Burns, C.M., 1993. Field trial of four cowside antibiotic–residue screening test. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, Apr. 15, 202(8): 1249-54.

Smith, J.T.,1986. The mode of action of 4 quinolones and possible mechanisms of resistance. *J. Antimicrob. Chemother.*, 18: 21-9.

Stalhamm, R.; Lode, H., 1989. Consideraciones generales sobre seguridad: Toxicidad. Efectos adversos y modo de interacción de las quinolonas. *En: las quinolonas. Academic Press Limited. San Diego. CA. EEUU. Capítulo 6: 221-58.*

Suhren, G., 2002. Hemmstoffe und Tierarzneimittelrückstände in Milch–rechtliche Grundlagen, Nachweisverfahren, Untersuchungssysteme. *Kieler Milchwirtschaftl. Forschungsberichte*, 54: 35-71.

Suhren, G.; Heeschen, W., 1993. Detection of tetracyclines in milk by *Bacillus cereus* microtitre test with indicator. *Milchwissenschaft*, 48(5): 259-63.

Sundlof, S.F., 1989. Drug and chemical residues in Livestock. *Food Animal Practice*, 5(2): 424-30.

Sundlof, S.F.; Kaneene, J.B.; Miller, R., 1995. National survey on veterinarian-initiated drug use in lactating dairy cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 194(7): 918-21.

Tikofsky, L.L.; Barlow, J.W.; Santisteban, C.; Schukken, Y.H., 2003. A comparison of antimicrobial susceptibility patterns for *Staphylococcus aureus* in organic and conventional dairy herds. *Microb. Drug Resist.*, 9(1): 39-45.

Tollefson, L.; Altekruze, S.F.; Potter, M.E., 1997. Therapeutic antibiotics in animal feeds and antibiotic resistance. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 16(2): 709-15.

Tyler, J.W.; Cullor, J.S.; Erskine, R.J.; Smith, W.L.; Dellinger, J.; McClure, K., 1992. Milk antimicrobial drug residue assay result in cattle with experimental, endotoxin–induced mastitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, Nov. 1, 201(9): 1378-84.

Van Eenennaam, A.L.; Cullor, J.S.; Perani, L.; Gardner, I.A.; Smith, W.L.; Dellinger, J.; Guterbock, W.M.; Jensen, L., 1993. Evaluation of milk antibiotic residue screening test in cattle with naturally occurring clinical mastitis. *J. Dairy Sci.*, Oct., 76(10): 3041-53.

Wayne, R.F., 1993. Responsibilities of food animal practitioners regarding extra–level use of drug. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 202(10): 1733-4.

Weaver, D.F., 1992. Antibiotic residues in milk and meat: perceptions and realities. *Vet. Med.*, 87(12): 1222-8.

Wishart, D.F., 1983. Antibiotic in meat and milk. *Vet. Rec.*, 118: 491-6.

Ziv, G.; Kurtz, B.; Risenberg, R.; Glickman, A., 1995. Serum and milk concentrations of apramicina in lactating cows, ewes and goats. *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, 18(5): 346-51.

Anexo 1-A

Materiales y Equipos utilizados en Delvotest SP (Gist Brocades ®, Holanda).

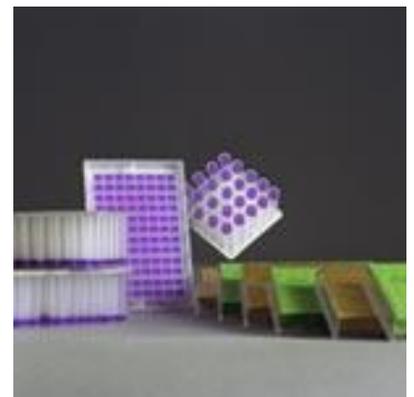


- Incubadora y termómetro.
- Tabletas nutritivas y pinzas.
- Dispensador de muestras, con pipetas desechables.
- Ampollas selladas.

Unidad completa, en su maletín transportable, conteniendo todos los materiales necesarios para la realización de la prueba.



Ampollas con medio agar solidificado al fondo, conteniendo esporas de *Bacillus stearothermophilus*, en estado de latencia.



Anexo 1-B

Método de Delvotest SP (Gist Brocades ®, Holanda).

Tests

Delvotest

Delvotest® ampoule photo instructions



1. Cut off the required number of ampoules with a pair of scissors. Be careful not to damage the foil of remaining ampoules.



2. Open ampoules by punching a hole in the aluminium foil with the syringe. Mark the ampoules for sample identification.



3. Add one nutrient tablet to each ampoule upon the solid agar with the tweezers. Do not touch the tablets with your fingers.



4. Attach a new disposable pipette to the syringe. Do not touch the tip-end which will be in contact with the milk.



5. Depress the plunger completely, dip the tip in the milk sample and allow the plunger to return slowly under pressure of the spring.



6. Empty the syringe into the corresponding marked ampoule by slowly depressing the plunger of the syringe. Use a fresh disposable pipette for each milk sample.



7. Check the temperature of the incubator (64°C). Put the ampoules into the incubator. Record the time and set timer for; **P** ampoules 2 1/2 hours or for **SP** ampoules 3 hours or use control time.



8. Read the colour of the lower 2/3 part of the solid agar in the ampoules after the required incubation time.

Delvotest® reading colours

Negative



Detection Limit



Positive



Colours are indicative.

Anexo 2

Materiales y método de Delvotest X-PRESS β L-II (Gist Brocades $\text{\textcircled{R}}$, Holanda).

Tests

Technical Bulletin

Delvo-X-PRESS $\text{\textcircled{R}}$ β L-II

photo instructions



1. Pipette 0.2ml of STANDARD or SAMPLE into corresponding COATED TUBES. Pipette 0.2ml of TRACER (bottle 1) into all COATED TUBES.



4. Pipette 1.0ml COLOUR DEVELOPER (bottle 2) into all COATED TUBES.



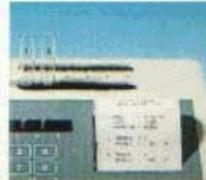
2. Incubate 3 minutes at 64°C in row A.



5. Incubate 3 minutes at room temperature in row B.



3. Wash all COATED TUBES 3 times with WASH SOLUTION.



6. Automatic read out of results.

(summarised procedure)

| Delvo-X-PRESS $\text{\textcircled{R}}$ β L-II (β -lactam) reading ISR(P)-workstation | |
|---|---------------------------------|
| Negative | Positive |
| -03, 02, -01 Reader Units | 00, +01, +02 Reader Units |

For more information please contact:

DSM Food Specialties
Dairy Ingredients
P.O. Box 1 2600 MA Delft
The Netherlands
Tel.: +31-15-2792355
Fax: +31-15-2793200

or our local representative :

*To the best of our knowledge, the information contained herein is accurate and complete. However, nothing herein contained shall be construed to imply any warranty or guarantee.

T1b dxp BLII photo 9912e1

Anexo 3

Materiales y Equipos del método Snap (IDEXX®, EE.UU.)



**“Multi-Block Heater”
(Lab-Line, Arquimed®).**



**“Image Reader”
(Lab-Line, Arquimed®).**