

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

División de Ciencias Veterinarias

POST-GRADO INTERINSTITUCIONAL
EN CIENCIAS PECUARIAS



CINÉTICA DE ELIMINACIÓN DE ANTIMICROBIANOS EN
LECHE APLICADOS CON FINES TERAPÉUTICOS A VACAS.

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS PECUARIAS
PRESENTA:

M.V.Z. CARLOS PACHECO GALLARDO

CUERPO TUTORIAL:

TUTOR: DR. Delia G. González Aguilar

ASESOR: DR. Agustín Ramírez Alvarez

ASESOR: DR. Efraín Pérez Torres

Las Agujas, Nextipac, Zapopan. Jal. Abril de 2001

Agradecimientos

Agradezco a Dios por permitirme la vida y poder llegar a este momento importante en mi vida.

Agradezco a mi esposa Katy por la paciencia y apoyo para la realización de este trabajo.

Agradezco a mis hijos, Carlos Humberto, Sarahí y Abraham por su cariño y apoyo incondicionales.

Agradezco a mis padres por su apoyo y comprensión.

Agradezco a mis hermanos, Ana, Gerardo, Claudia, Laura, Alberto y Astrid por su ánimo infundado en la terminación de este trabajo.

Agradezco a mis tutores, asesores y sinodales por su cooperación en la realización de este trabajo.

Agradezco a SUPERA por la beca otorgada para la entrega de este trabajo.

Agradezco a mis compañeros del Departamento de Salud Pública del CUCBA, UDG por su amistad y ánimo para la realización de este trabajo.



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
DIVISIÓN DE CIENCIAS VETERINARIAS
COORDINACIÓN DE POSGRADO

DR. MARCELINO VAZQUEZ GARCIA
COORDINADOR DE POSGRADO DEL CUCBA
PRESENTE.

Por éste conducto hago de su conocimiento que el MVZ CARLOS PACHECO GALLARDO, estudiante del Programa de Maestría del Posgrado en Ciencias Pecuarias de la Universidad de Guadalajara, ha cumplido con todos los requisitos académicos que marca el dictamen del respectivo posgrado, además que ha concluido satisfactoriamente su trabajo de tesis que lleva como título:

"CINÉTICA DE ELIMINACIÓN DE ANTIMICROBIANOS EN LECHE APLICADOS CON FINES TERAPÉUTICOS A VACAS".

Por lo que le informo que la coordinación a mi cargo determinó la autorización para la impresión de la misma y su defensa para el día 6 de Abril del presente año a las 10:00 h. Los sinodales propuestos para su evaluación son los siguientes:

Presidente: Dr. EFRAIN PEREZ TORRES
Secretario: Dr. HUGO CASTAÑEDA VAZQUEZ
Primer Vocal: M en C. RICARDO ALANIZ DE LA O.
Segundo Vocal: M. en C. ANGELICA LUISJUAN MORALES
Tercer Vocal: Dr. AGUSTIN RAMIREZ ALVAREZ

Suplente: Dra. Margarita Hernández Gallardo

Agradeciendo de antemano su valioso apoyo, me despido no sin antes enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal. a 29 de Marzo de 2001.

DR. JACINTO BANUELOS PINEDA
COORDINADOR DE POSGRADO DE LA
DIVISIÓN DE CIENCIAS VETERINARIAS



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
DIVISIÓN DE CIENCIAS VETERINARIAS
COORDINACIÓN DE POSGRADO

H. CUERPO COLEGIADO
DEL POSGRADO INTERINSTITUCIONAL EN CIENCIAS PECUARIAS DE LA UNIVERSIDAD DE
GUADALAJARA
PRESENTE.

Por éste conducto nos permitimos enviar la **VERSION FINAL DE LA TESIS** que desarrolló el pasante del Programa de Maestría en Ciencias Pecuarias (PICP) de la Universidad de Guadalajara, MVZ CARLOS PACHECO GALLARDO, cuyo título es:

"CINÉTICA DE ELIMINACIÓN DE ANTIMICROBIANOS EN LECHE APLICADOS CON FINES TERAPÉUTICOS A VACAS".

Trabajo dirigido por: Dra. DELIA G. GONZALEZ AGUILAR.

Los que suscriben la presente avalan esta versión, la cual fue revisada y reúne los requisitos teóricos y metodológicos necesarios.

ATENTAMENTE

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal., a 23 de Marzo de 2001

REVISOR
Dr. AGUSTÍN RAMÍREZ BLVAREZ

REVISOR
M en C. RICARDO ALANIZ DE LA O.

REVISOR
M. en C. ANGÉLICA LUISJUAN MORALES

REVISOR
Dr. EFRAIN PEREZ TORRES

Hugo Castañeda V.
REVISOR
Dr. HUGO CASTAÑEDA VAZQUEZ

CONTENIDO

Resumen	X
Introducción	1
Planteamiento del Problema	9
Justificación	11
Hipótesis	12
Objetivos	13
Metodología	14
Resultados	19
Discusión	35
Conclusiones	40
Bibliografía	41

RESUMEN

La producción de leche esta estrechamente relacionada con el uso de medicamentos veterinarios con el propósito de asegurar el rendimiento de los animales en producción así como para el tratamiento de patologías específicas. Por ser la leche una fuente barata de proteína animal para la población y por carecer de información específica de nuestro medio en relación a los periodos de restricción, se investigó el tiempo de la presencia de residuos en leche de Cefalexina, Oxitetraciclina, Estreptomina con Penicilina G y Sulfadimidina con Trimetoprim (TMP). Se procesaron 380 muestras obtenidas del rancho Cofradía de la U. de G. vacas en producción y sometidas a tratamiento terapéutico. Se determinó el tiempo de eliminación en leche mediante los métodos microbiológicos de difusión en agar con pH 6, 7.5, 7.5 con TMP, pH 8 y la Norma Oficial Mexicana F-425-83 "Determinación de inhibidores microbianos en leche fluida". La muestra se colocó en disco y cilindro para ambos métodos. Se registró tipo de fármaco, vía de administración, dosis y número de aplicaciones. Con los resultados obtenidos se determinó que el tiempo de eliminación de Cefalexina en leche fue de 48 horas, no coincidió con lo marcado por el laboratorio fabricante. Con Oxitetraciclina fue de 72 horas en comparación con el periodo marcado por el fabricante que fue de 60 horas. En el caso de Estreptomina con Penicilina G existieron residuos en leche hasta por 72 horas coincidiendo con lo marcado por fabricante. El tiempo de eliminación del Sulfato de Sulfadimidina con TMP fue de 60 horas en comparación con lo marcado por el laboratorio fabricante que indica 48 horas. En conclusión es importante la aplicación de métodos sensibles a la presencia de residuos de antimicrobianos en leche y el desarrollo de investigaciones para verificar los verdaderos tiempos de eliminación en condiciones normales de terapéutica para el beneficio de consumidores y productores de leche.

INTRODUCCION :

La producción animal de donde se obtienen los alimentos, de mayor valor biológico para el hombre esta estrechamente relacionada con el uso de medicamentos veterinarios y aditivos alimentarios entre otros compuestos, con el propósito de asegurar y aumentar la productividad de los animales (Briones 1999, Hapke 1997).

La terapia antimicrobiana ha sido utilizada en el manejo de la salud de los animales productores de alimento por más de 50 años. Los antimicrobianos son aplicados a vacas para el control de patologías por diferentes vías: oral, intravenosa, intramamaria e intrauterina principalmente. Desafortunadamente todas éstas vías, en dependencia del medicamento utilizado pueden dejar residuos de estas sustancias en la leche (Cullor 1994; FAO/OMS 1991; Mitchell 1995).

La presencia de residuos de antimicrobianos en leche es indeseable por muchas razones, entre otras, porque pueden desencadenar reacciones de hipersensibilidad en la población, favorecen la ocurrencia de organismos resistentes a los antimicrobianos e inhiben el proceso de fermentación en productos lácteos y cárnicos (Coleman 1995, McEwen 1991, Sundolf 1998).

La presencia de residuos de antimicrobianos en leche, se atribuye especialmente a la no observancia de las indicaciones sobre el uso adecuado de los antimicrobianos, referente al periodo de restricción (PR), en el sentido del tiempo que no debe ser consumida la leche de la vaca tratada según las instrucciones del producto.

Por tal motivo en diferentes países han establecido PR oficiales y límites máximos permitidos, que de acuerdo al tipo y concentración del medicamento presente en la leche no será comercializada, en virtud de los diversos riesgos para la salud del consumidor. (FAO/OMS 1996, Food and Drug Administration 1989, Payne 1993, Ramírez 1994). Cuadro 1

Estos periodos de eliminación son usualmente determinados en animales sanos y generalmente en otros países con otro tipo de razas y variedades a las existentes en México. Los parámetros farmacocinéticos toman en cuenta las leyes básicas de la cinética de fármacos en organismos vivos. El concepto de "cinética de 1^{er}. orden" consiste en que un medicamento aplicado a un organismo, pasará de un lado a otro de la membrana celular en función de la cantidad del fármaco presente dando como resultado que a mayor concentración, más cantidad del mismo estará en los tejidos y en consecuencia el tiempo de eliminación será mayor (Sumano y Ocampo 1996).

Para completar la eliminación total de un fármaco es necesario que se lleven a cabo procedimientos físicos y químicos en el organismo que consisten en : Absorción, Distribución y Biotransformación para finalizar con la eliminación. Este último procedimiento se realiza por diferentes vías : orina, heces, sudor, saliva, leche, etc.

En términos generales la vía de aplicación influye en los diferentes mecanismos de excreción, que dependen de las leyes descritas para la distribución. Por lo tanto las velocidades de excreción de los fármacos dependerán de las propiedades hemodinámicas del individuo. Así mismo serán diferentes en los animales enfermos e incluso individuos sanos de la misma especie (Britt 1999).

Bajo este principio en la eliminación de antimicrobianos aplicados por vía intramamaria influye básicamente el pH de la leche (6.5-6.9) con respecto a la sangre que es de 7.4 en donde los antimicrobianos alcalinos tenderán a concentrarse en leche llegando a estar hasta 4.5 veces más que en plasma (Van-Eenenaam 1993).

Con el fin de evitar los residuos de antimicrobianos, la legislación vigente en diferentes países exige que en los productos farmacéuticos veterinarios destinados a animales proveedores de alimentos para el hombre, se indique en una leyenda el PR, el cual es necesario para que el animal elimine el medicamento hasta un nivel en que se espera no tenga efectos nocivos (Andrew 1997; FAO/OMS 1996). (Cuadro 2)

Los periodos de eliminación de medicamentos dependen primordialmente de la especie animal, principio activo, sal del fármaco, vehículo, dosis, vía de administración, frecuencia de administración, duración del tratamiento. Diversos autores como Cullor (1994), Heeschen (1991), Mc.Ewen (1991), Owens (1997), Sischo (1996), Van-Eenennam (1993), entre otros, han comprobado que estos se ven influidos por múltiples factores, por lo que se esperan periodos de eliminación parcialmente diferentes al PR señalado por el laboratorio fabricante además de ciertas variaciones relacionadas con el clima, ya que la temperatura ambiental influye en el metabolismo, afectando así la velocidad del tiempo de eliminación por leche y por lo tanto alterando el PR.

Respecto a este punto Sumano (1995) sugiere por ejemplo que a los aminoglucósidos como la Estreptomycin aplicada por vía intramamaria a la que se le indica usualmente un PR de 4 y 13 ordeñas se le hagan pruebas individuales, ya que la eliminación puede ser muy variable y prolongarse hasta por 36 días.

La disponibilidad de métodos analíticos para determinar con seguridad la presencia de residuos de antimicrobianos en los diferentes sectores involucrados en la producción y transformación de la leche deben poseer características de rendimiento necesarias para poder utilizarlos como métodos reglamentarios con el fin de obtener datos cualitativos y cuantitativos que indiquen claramente los límites mínimos aceptables por la Organización Mundial de la Salud.

Un método microbiológico de difusión en agar inoculado con un microorganismo sensible a sustancias inhibidoras es útil su aplicación como tamiz para evidenciar la presencia de residuos, sin especificar tipo y concentraciones de antimicrobianos, éste puede aplicarse para establecer el tiempo de eliminación por leche (I.D.F. 1991, Musser 1999, Thornsberry 1997). Aunque carecen de especificidad, los métodos de tamizaje microbiológicos, permiten detectar un amplio rango de grupos de antimicrobianos en corto tiempo (24 horas) y comparado con otros métodos, a un bajo costo (Guerrero 1997).

Actualmente diferentes organismos internacionales así como en la investigación de la presencia en la leche de residuos antimicrobianos en leche en varios países de Europa aplican procedimientos de difusión en agar con *B. stearothermophilus* como cepa de prueba métodos diversos (Wolter 1999).

Existen métodos analíticos muy sensibles como la Cromatografía de gases (CG), Cromatografía de Líquidos (HPLC) y Electroforesis que determinan cuantitativa y cualitativamente antimicrobianos y sus metabolitos presentes en leche, aún en muestras con múltiples residuos (Argawal 1992).

Es importante considerar la verificación de los PR de productos veterinarios con el propósito de comprobar que no existan residuos de antimicrobianos en leche posterior a la última aplicación y tiempo de espera señalado por el laboratorio.

En un estudio se compararon los PR fijados por la F.D.A. de E.U. y la S.A.G.A.R.P.A en México y se llegó a la conclusión de que muchos PR equivalentes a las sustancias incluidas en sus fórmulas no coinciden con medicamentos registrados en nuestro país, e inclusive algunos no indican este periodo en sus etiquetas (Amézquita y col. 1994). Cuadro 3.

En Inglaterra Hoog y col. en 1992 realizaron un estudio para la determinación del tiempo de eliminación de inhibidores en leche aplicados por vía intramamaria, los resultados obtenidos no coincidieron con el tiempo registrado en los productos farmacéuticos. La Penicilina en combinación con la Estreptomina administrado en un tratamiento prolongado, tuvo un tiempo de eliminación, 6 días más de lo indicado.

En México el control oficial del uso de medicamentos en la producción pecuaria y de residuos farmacológicos en alimentos de origen animal es deficiente. Esto favorece que el productor pecuario no respete los periodos de retiro teniendo como consecuencia la presencia de residuos en alimentos de origen animal. El médico veterinario es quien debe de elegir el antibiótico específico para cada enfermedad, hacer las recomendaciones de uso adecuadas para las vacas en producción y señalar con precisión el periodo en que la leche producida no es apta para consumo humano. Además de prescribir mediante receta médica dosis, vía y frecuencia de administración debe indicar la duración del tratamiento para obtener un mayor control de los tipos de medicamentos administrados y como llevar un registro de las vacas tratadas.

La información farmacocinética es sumamente importante para predecir cuando un medicamento debe de ser suspendido para asegurar concentraciones no violativas del mismo en leche y tejidos de animales de abasto al tiempo de sacrificio (Soriano 1996).

Diferentes estudios señalan, que productos con el mismo principio activo y concentración, e incluso, con aparentemente la misma formulación no son bioequivalentes por cierta manipulación farmacéutica. Por lo tanto las indicaciones terapéuticas y/o dosis recomendadas en su lugar de origen no siempre son adecuadas para otro país; pero sobre todo, su periodo de eliminación no podrá señalarse con exactitud por extrapolación de datos de los laboratorios fabricantes al país de exportación (Herrick 1997).

Según la legislación sanitaria vigente en México, para considerar a los alimentos de origen animal como aptos para consumo humano deben, entre otras cosas, estar libres de residuos de medicamentos antibacterianos (Secretaría de Salud 1999).

Algunos estudios en nuestro país han evidenciado la presencia de residuos de antimicrobianos en leche y su impacto en salud pública (Infante 1999).

La magnitud del problema se desconoce en Jalisco por la escasez de estudios y el deficiente control oficial en esta región, sin embargo, existen algunos estudios por el Departamento de Salud Pública del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara en la que reportan la situación de la presencia de residuos de antimicrobianos en alimentos de origen animal realizados por : Ramos 1992, Uribe 1993, Torres 1995, Guerrero 1997, Chávez 1998, Sánchez 2000.

Cuadro 1. Límites máximos permitidos en leche (MRL)

Substancia farmacológicamente activa	MRL (MG/Kg)
Bencilpenicilina	4
Amoxicilina	4
Cloxacilina	30
Sulfonamida	100
Espiramicina	200
Ácido clavulánico	200
Eritromicina	40
Ceftiofur	500
Neomicina	500
Estreptomina	200
Dihidroestreptomina	200
Gentamicina	100

Fuente: Wolter 1999

CUADRO 2. MEDICAMENTOS APLICADOS EN VACAS LECHERAS Y SUS PERIODOS DE RESTRICCIÓN

MEDICAMENTO	Nº DE ORDEÑOS POR ELIMINAR	HORAS
AMPICILINA TRIHIDRATO	4	48
DIHIDROESTREPTOMICINA	4	48
ERITROMICINA	6	72
FUROSEMIDA	4	48
PENICILINA G PROCAINICA	4	48
PENICILINA G PROCAINICA CON DIHIDROESTREPTOMICINA	4	48
SULFADIMIDINA	5	60

Fuente: Center for Veterinary Medicine 1989; y F.D.A. 1993 appendix 5.

**CUADRO 3. PERIODOS DE RESTRICCIÓN EN LECHE DE
MEDICAMENTOS VETERINARIOS EN MÉXICO Y E.U.**

MEDICAMENTO	PR MEXICO*	PR U.S.A.**
AMPICILINA	3	4 DIAS
DIHIDROESTREPTOMICINA	4	4 "
ERITROMICINA	6	1.5 "
PENICILINA G PROCAINICA	0	4 "
SULFADIMIDINA	5	4 "
PENICILINA G PROCAINICA COMBINADA	5	4 "

PR: Periodo de restricción

* Fuente: prontuario de especialidades veterinarias 14a. edición 93 - 94, y

**Center of Veterinary Medicine cvm-memo 27. F.D.A. U.S.A. 1989.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA :

La industria lechera produce una gran variedad de alimentos que son consumidos diariamente, como queso, yogurth y leche fluida entre otros, los cuales deben cumplir con las normas específicas de calidad e inocuidad para que sean reconocidos según las normas correspondientes como "aptos para el consumo humano".

La presencia de residuos de antibióticos en leche es un problema al que se han enfrentado varios países por más de 4 décadas. En los países desarrollados se han establecido programas eficientes de control, capacitación y educación de personas relacionadas con la producción láctea, mediante monitoreos y severas sanciones al infractor (Infante 1999).

En México a pesar de la existencia de reglamentos y normas oficiales tendientes a controlar el problema de la presencia de residuos indeseables en los alimentos de origen animal no se lleva a cabo un programa de control oficial que especifique las medidas y sanciones a tomar para el infractor, por otra parte los periodos de restricción indicados en los fármacos veterinarios no son oficiales. Lo que contribuye a que los ganaderos no observen adecuadamente los PR de los antimicrobianos aplicados a vacas productoras.

Algunas empresas enfriadoras y procesadoras llevan un control mediante diferentes métodos para la determinación de residuos de antimicrobianos, castigando el precio de la leche por la presencia de residuos al productor.

Una de las limitantes en México para que el control sanitario de alimentos de origen animal pueda ser efectivo, es de orden estructural y está relacionada con la división artificial en las competencias legales que existen en la vigilancia oficial entre la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), y la Secretaría de Salud (S.S.) que fracciona

la cadena alimenticia y de comercialización, con lo que se pierde la integridad necesaria para el abordaje objetivo (Ramírez 1994).

Los organismos oficiales del país con competencia en la materia deben tomar en cuenta dos grandes problemas que acarrea la aplicación sin control de antimicrobianos en animales proveedores de leche, el primero es el que influye en Salud Pública:

- a) Favoreciendo la proliferación microorganismos resistentes, que en el caso de patógenos impacta la terapéutica humana y veterinaria.
- b) Cambios en la flora microbiana intestinal humana
- c) Padecimientos alérgicos en personas sensibles.

(FAO/OMS 1996, Gustafson 1997, Tollefson 1997)

También existe un efecto negativo en la industria procesadora de leche, que le causa elevadas pérdidas económicas por el desarrollo de baja acidez, y por lo tanto la falta de coagulación en productos fermentados; se estima que por esta causa se pierden anualmente cientos de millones de pesos.

J U S T I F I C A C I O N :

Los estudios farmacocinéticos realizados por los laboratorios fabricantes de medicamentos veterinarios tienen como objetivo determinar la acción del fármaco en un organismo bajo condiciones controladas e identificar factores que influyen en la absorción, distribución, biotransformación y de eliminación. Los resultados demostraran las características clínicas del fármaco así como la vida media y tiempo de eliminación.

En México existen empresas farmacéuticas de renombre internacional que registran los tiempos de eliminación de sus medicamentos obtenidos en el país de origen ante las autoridades correspondientes. Dado que las condiciones intrínsecas y extrínsecas de los animales, son diferentes en nuestro país de donde se realizan los estudios del laboratorio fabricante para fijar los tiempos de eliminación, estos periodos tienden a cambiar en el proceso salud – enfermedad de los animales tratados.

Por lo tanto es imperativo desarrollar investigaciones de la cinética de eliminación en condiciones ambientales específicas de México, considerando las características internas y externas de los animales en donde se aplican antimicrobianos para el control de patologías y poder determinar la presencia de residuos en leche de vacas en producción mediante métodos sensibles y económicos.

Los resultados de este estudio serán de utilidad para el M.V.Z. dedicado a la práctica veterinaria de bovinos productores de leche, y para las autoridades comprometidas en el control respectivo.

HIPOTESIS

Si los periodos de restricción de antimicrobianos en leche se han fijado en base a estudios de otros países efectuados con vacas sanas, y la farmacocinética es influenciada por factores intrínsecos y extrínsecos del animal entre ellos el proceso salud–enfermedad, entonces la velocidad de eliminación del medicamento y por tanto el periodo de restricción indicado será diferente en vacas enfermas en condiciones ambientales tropicales.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la cinética de eliminación de antimicrobianos en leche aplicados con fines terapéuticos a vacas comparando 2 métodos microbiológicos de difusión en agar.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Determinar el periodo de eliminación de 2 productos comerciales con sales únicas : Monohidrato de Cefalexina y la Oxitetraciclina.
- 2.-Establecer el periodo de eliminación de 2 productos comerciales con sales combinadas : la Penicilina G Procaínica con Dihidroestreptomicina y la Sulfadimidina con trimetoprim.
- 3.-Comparación del método de la NOM-F-425-83 "Determinación de inhibidores en leche fluida" con el método microbiológico de difusión en agar con 4 placas con medio de cultivo a un pH de 6, 7.5, 7.5 con 0.075 ppm de Trimetoprim y pH 8.

M E T O D O L O G Í A :

El presente estudio fue realizado en el área de Residuos Tóxicos del Departamento de Salud Pública del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara.

Muestreo y recolección :

Se tomaron muestras de leche en la Posta Zootécnica Cofradía de la Universidad de Guadalajara de 26 vacas en producción, posterior a la última aplicación del tratamiento terapéutico con antimicrobianos (Cuadro 4). Fueron registrados los siguientes parámetros: dosis, vía de administración, tipo de medicamento, frecuencia de administración y duración del tratamiento.

Cuadro 4. Registro de tratamientos terapéuticos de vacas en producción

ANTIMI-CROBIANO	USO TERAPÉUTICO	VIA DE APLICACIÓN	FRECUENCIA DEL TRATAMIENTO	DURACIÓN DEL TRATAMIENTO	Nº DE VACAS
Cefalexina	mastitis	intramamaria	cada 24 horas	24 horas	4
Oxitetraciclina	Metritis Endometritis	Intrauterina	cada 24 horas	24 horas	11
	Neumonía	Intravenosa	cada 24 horas	72 horas	2
Sulfato de Estreptomina con Penicilina G procaínica	Mastitis e Intervención quirúrgica	Intramuscular	cada 24 horas	48 horas	7
Sulfonato de Sulfadimidina con *TMP	Mastitis, Metritis	Intramuscular	cada 24 horas	48 horas	2
Total					26

*TMP= Trimetoprim

Fueron obtenidas un total de 380 muestras de leche. Cada muestra representó la mezcla de los 4 cuartos de la glándula mamaria obteniéndose 20 ml por vaca y por ordeño. El muestreo tuvo una duración de 7 meses (Febrero a Septiembre). Se tomaron muestras consecutivas cada 12 horas posterior a la última aplicación del antimicrobiano hasta obtener resultados negativos de cada vaca tratada

Transporte y conservación de la muestras :

Las muestras se transportaron en frascos (libres de inhibidores) previamente identificados y se conservaron entre de 4° y 7° C hasta su procesamiento en el laboratorio. Las muestras que no fueron analizadas dentro de las primeras 24 horas de obtención, se sometieron a congelación de -20° C hasta un tiempo máximo de conservación 72 horas.

Preparación de placas para la detección de residuos de antimicrobianos:

Se aplicaron 2 métodos: La NOM-F-425-83 "DETERMINACIÓN DE INHIBIDORES EN LECHE FLUIDA" (SECOFI 1983) preparando las placas con las siguientes características: 3.05 grs de medio para antibióticos N° 1 de Grove y Randall® para 100 ml de agua destilada, ajustando el pH a 6, para vaciar en las placas dejando gelificar a temperatura ambiente.

Para el método microbiológico de difusión en agar de 4 placas (Bundesanzeiger 1996) se preparó el medio de cultivo en base a la siguiente fórmula para preparar 100 ml del agar :

Peptona de caseína	0.34 grs.
Peptona de Carne	0.34 grs.
Cloruro de sodio	0.51 grs.
Agar bacteriológico	1.3 grs.
Agua destilada	100ml
Fosfato de potasio monobásico	0.01%

El medio de cultivo para ambos métodos fue inoculado con *Bacillus subtilis*-ATCC-6633 a una concentración de 10^6 U.F.C.* / ml de medio

Se ajustó el pH con soluciones de HCl 10 N y con NaOH 10 N (Cuadro 5) y se esterilizaron en autoclave a 121° C por 15 minutos para posteriormente ser inoculados a una temperatura de $40-50^{\circ}$ C con el *B. subtilis* para los 2 métodos colocando 10 ml del medio inoculado en las diferentes placas.

Cuadro 5. Identificación de placas

Placa	pH del medio
1	6
2	7.5
3	7.5 con Trimetropim 0.075 ppm
4	8
5	6 (NOM-F-425-83)

Aplicación de la muestra:

Para el método de la NOM en 2 tubos de ensaye se aplicaron 2 ml de la muestra para adicionarle 1 ml de solución buffer N° 1 de fosfatos a pH 6 a cada tubo. Se homogenizó la muestra. Se sometió un tubo con la solución de la muestra a proceso térmico de 80° C por tres minutos. En discos de papel filtro Whatman N° 4 de 6 mm de diámetro se colocaron 10 μ l de la solución con muestra del tubo sin tratamiento térmico, identificándola como fría, y 10 μ l de la solución de la muestra del tubo con tratamiento térmico que se identificó como caliente, para colocarse en la placa identificada como NOM. En otra placa con el mismo tipo de medio de cultivo se aplicaron las mismas soluciones de los tubos (fría y caliente) 200 μ l en cilindros de acero inoxidable estériles de 8X10mm. (Figura 1)

U.F.C.*= unidades formadoras de colonias

Para el método de Tetraplaca se tomaron directamente de las muestras 10 μ l y se colocaron en disco de papel filtro Whatman N° 4 de 6 mm de diámetro y 200 μ l para colocarlos en cilindros de acero inoxidable de 8X10 mm sobre las placas identificadas como pH 6, pH 7.5, pH 7.5 con Trimetoprim y pH 8. (Figura 1)

En cada placa se colocó un disco control con antimicrobiano estándar de referencia como sigue:

Penicilina G sódica® 0.01 UI/disco en el medio ajustado a pH 6 y para la NOM.

Sulfato de Estreptomina® 0.5 μ g en el medio de cultivo ajustado a pH 8.

Sulfametoxazole® 0.5 μ g en el medio de cultivo ajustado a pH 7.5 y en el medio de pH 7.5 con TMP.

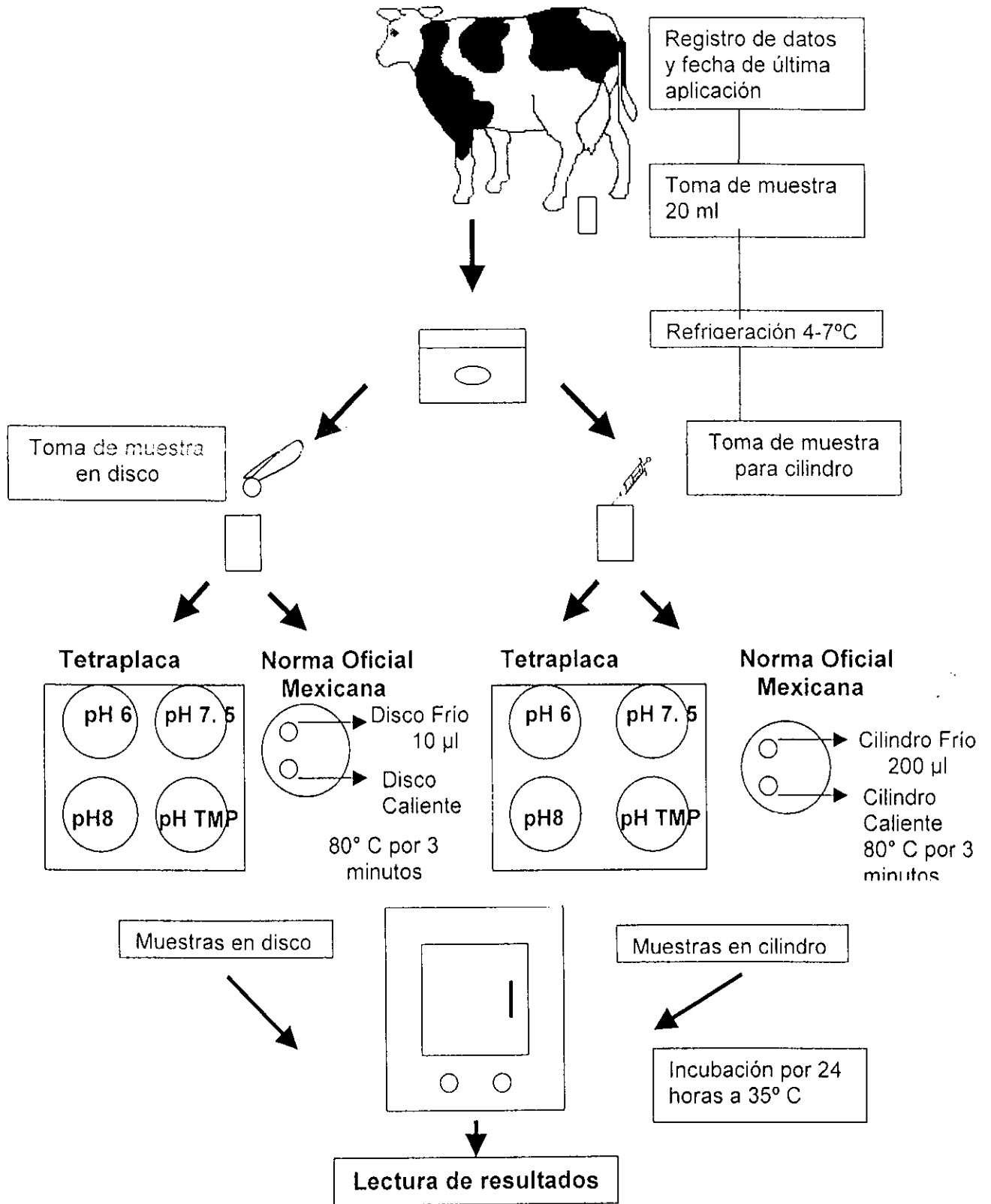
Los resultados se obtuvieron a las 24 horas de incubación de 33° a 35° C. Se registró la medida del halo de inhibición bacteriana en mm y el pH del medio de cultivo. Se verificó que los discos control presentaran halos de inhibición de 5 a 10 mm. El halo se midió del borde del disco y cilindro al límite de la inhibición. Se consideraron como positivas las muestras con un halo mayor de 1 mm tanto en disco como en cilindro.

Evaluación de los resultados :

Se registraron los resultados positivos por muestra en base al medicamento, dosis y vía de aplicación para obtener un promedio en mm de los halos de inhibición. Se aplicó el método estadístico de Análisis de Varianza para todos los datos y valorar su significancia estadística.

Además se comparó el tiempo obtenido de eliminación del medicamento con lo indicado por el laboratorio fabricante y los datos oficiales de la F.D.A. (F.D.A. 1989, F.D.A. 1993)

Fig. 1 Procedimiento de obtención y análisis de la muestra.



RESULTADOS:

MONOHIDRATO DE CEFALEXINA:

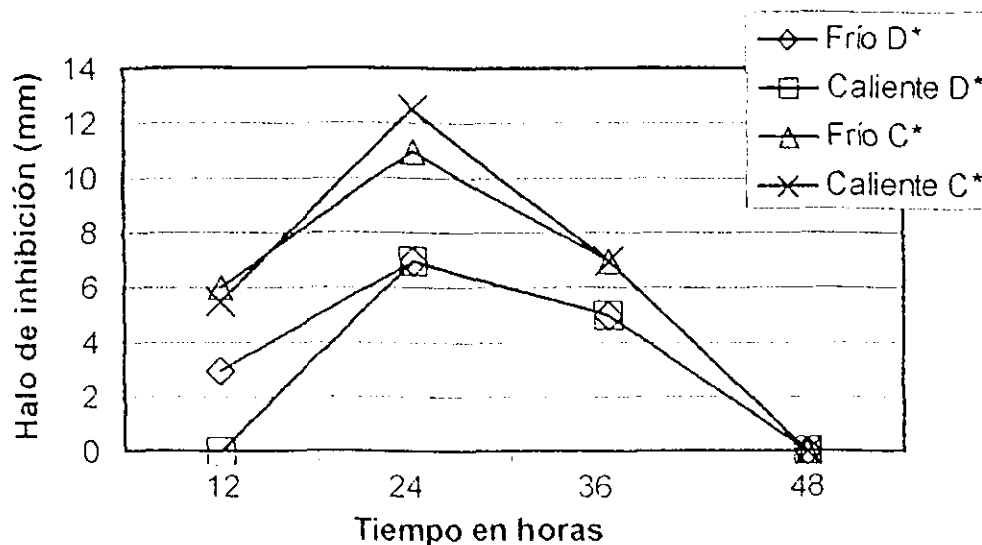
Este medicamento se aplicó como tratamiento para mastitis por vía intramamaria a una dosis de 500 mgs por un día por cuarto afectado en 4 vacas. Se obtuvo un periodo de eliminación de 48 horas en los métodos de la NOM y Tetraplaca.

Los promedios de halos de inhibición con la NOM en disco y cilindro se pueden observar en el cuadro 6 en donde a las 24 horas se registraron los halos de mayor inhibición. En la Gráfica 1 se muestra la relación de inhibición de las muestras en disco y cilindro con el tiempo de eliminación.

Cuadro 6. Eliminación en leche del Monohidrato de Cefalexina (método de la NOM¹) aplicado por vía intramamaria

Tiempo en Horas	Muestra en disco (\bar{x} mm) ²		Muestra en cilindro (\bar{x} mm) ²	
	Frío	Caliente	Frío	Caliente
12	3	0	0	0
24	7	7	11	12.5
36	5	5	7	7
48	0	0	0	0

NOM¹= Norma Oficial Mexicana
 (\bar{x} mm)² = Promedio en milímetros



Gráfica 1. Periodo de eliminación en leche del Monohidrato de Cefalexina (método de Tetraplaca) aplicado por vía intramamaria

NOM*=Norma Oficial Mexicana

D*=Disco
C*=Cilindro

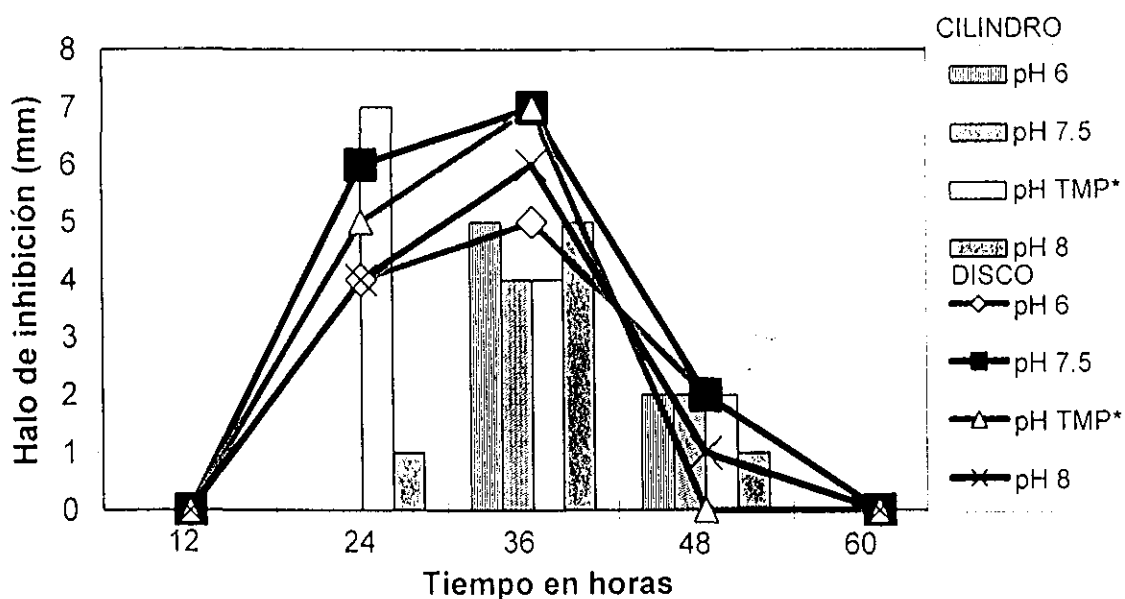
En el cuadro 7 se puede observar los halos inhibición determinados con el método de Tetraplaca en disco y cilindro en los diferentes pH. Se registraron halos de mayor inhibición a las 24 horas en disco en el pH con TMP y pH 8, las muestras colocadas en cilindro se detectaron halos en los 4 pH, no se obtuvieron resultados positivos a las 60 horas. En la Gráfica 2 se puede visualizar el comportamiento de las muestras colocadas en disco y cilindro así como el tiempo de la presencia de residuos de este medicamento en relación con los pH.

Cuadro 7. Eliminación en leche del Monohidrato de Cefalexina (método de Tetraplaca)¹ aplicado por vía intramamaria

Tiempo en horas	Muestra en disco (\bar{x} mm) ¹				Muestra en cilindro (\bar{x} mm) ¹			
	pH				pH			
	6	7.5	TMP ²	8	6	7.5	TMP ²	8
12	0	0	0	0	0	0	0	0
24	0	0	7	1	4	6	5	1
36	5	4	4	5	5	7	7	6
48	2	2	2	1	2	2	0	1
60	0	0	0	0	0	0	0	0

(\bar{x} mm)¹ = Promedio en milímetros

TMP² = pH 7.5 con 0.075 ppm de Trimetoprim



Gráfica 2. Periodo de eliminación en leche del Monohidrato de Cefalexina (método de Tetraplaca) aplicado por vía intramamaria

TMP* = pH 7.5 con 0.075 ppm de Trimetoprim

El valor estadístico de estos resultados mostraron que la diferencia entre la NOM y en el método de Tetraplaca para determinar el Monohidrato de Cefalexina aplicado por vía intramamaria no mostró gran diferencia estadística significativa ($p > 0.05$) en relación con los halos de inhibición, pH y la colocación de la muestra en disco y cilindro.

OXITETRACICLINA :

Este medicamento se utilizó en 11 vacas por vía Intrauterina con dosis de 2.5 grs. con una aplicación de cada 24 horas por 2 días para el tratamiento de Metritis y Endometritis y por vía intravenosa se aplicó en 2 vacas con dosis de 2 grs. cada 24 horas por 3 días para el tratamiento de Neumonía. En estos casos se obtuvo un periodo de eliminación por vía intrauterina de 60 horas y para la aplicación por vía intravenosa fue de 72 horas.

Vía intrauterina:

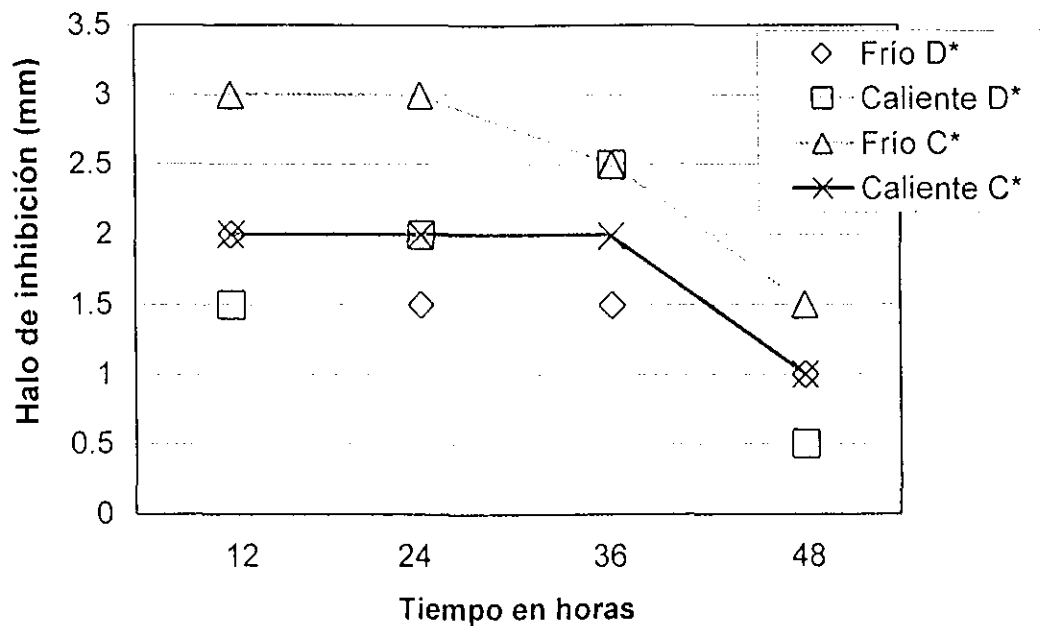
Los resultados de las muestras procesadas con la NOM se pueden observar en el cuadro 8 con los registros de los promedios de halos de inhibición en disco y cilindro, se obtuvieron mayores halos de inhibición en las muestras colocadas en cilindro a las 24 horas en comparación con los obtenidos en disco, a las 72 horas no se observaron halos en las muestras colocadas en disco y en cilindro fueron de 0.5 a 1 mm.

Cuadro 8. Eliminación en leche de Oxitetraciclina (método de la NOM¹) aplicada por vía intrauterina

Tiempo en horas	Muestra en disco (\bar{x} mm) ²		Muestra en cilindro (\bar{x} mm) ²	
	Frío	Caliente	Frío	Caliente
12	2	1.5	3	2
24	1.5	2	3	2
36	1.5	2.5	2.5	2
48	1	0.5	1.5	1
72	0	0	1	0.5

NOM¹= Norma Oficial Mexicana

(\bar{x} mm)² = Promedio en milímetros



Gráfica 3. Periodo de eliminación en leche de Oxitetraciclina (método de la NOM*) aplicada por vía intrauterina

NOM*: Norma oficial Mexicana

D*: Disco
C*: Cilindro

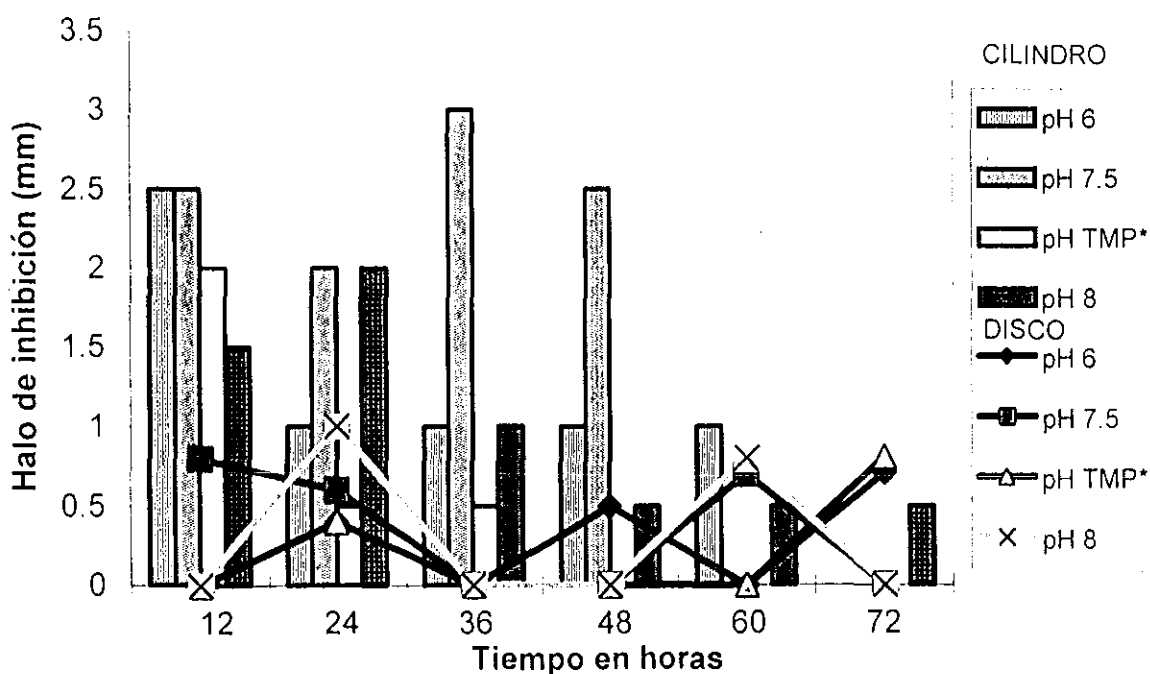
Con el método de tetraplaca se pueden visualizar los resultados en el cuadro 9 con los registros de halos de inhibición promedio de las muestras colocadas en disco y cilindro en los diferentes pH, se obtuvieron halos menores a 1 mm en disco en las 4 placas; en cilindro se observó en pH 7.5 halos de 3mm a las 36 horas posteriores a la última aplicación del medicamento, en comparación con disco que no mostraron halos de inhibición. (Gráfica 4)

Cuadro 9. Eliminación en leche de Oxitetraciclina (método de Tetraplaca) aplicada por vía intrauterina

Tiempo en horas	Muestra en Disco (\bar{x} mm) ¹				Muestra en cilindro (\bar{x} mm) ¹			
	PH				pH			
	6	7.5	TMP ²	8	6	7.5	TMP ²	8
12	0.8	0	0	0	2.5	2.5	2	1.5
24	0.4	0.6	0.3	1	1	2	0.5	2
36	0	0	0	0	1	3	0.5	1
48	0.5	0	0	0	0.7	2.5	0	0.3
60	0.7	0.7	0	0.8	1	0	0	0.5
72	0.7	0	0	0.8	0	0	0	0.2

(\bar{x} mm)¹ = Promedio en milímetros

TMP²= Medio de cultivo pH 7.5 con 0.075 ppm de Trimetoprim



Gráfica 4. Periodo de eliminación en leche de Oxitetraciclina (método de Tetraplaca) aplicada por vía intrauterina

TMP* = pH 7.5 con 0.075 ppm de Trimetoprim

Vía intravenosa:

Mediante la NOM no se detectaron residuos de Oxitetraciclina en leche, solamente a las 72 horas se observaron halos de inhibición en las muestras colocadas en cilindro como se muestra en el cuadro 10.

Cuadro 10. Eliminación en leche de Oxitetraciclina (método de la NOM¹) aplicada por vía intravenosa

Tiempo en Horas	Muestra en disco (\bar{x} mm) ²		Muestra en cilindro (\bar{x} mm) ²	
	Frío	Caliente	Frío	Caliente
12	0	0	0	0
24	0	0	0	0
36	0	0	0	0
48	0	0	0	0
72	0	0	1	0.2

NOM¹ = Norma Oficial Mexicana

(\bar{x} mm)² = Promedio en milímetros

Por medio de la técnica de 4 placas en disco se empezó a detectar residuos a las 48 horas de la última aplicación del medicamento presentando y en las muestras obtenidas a las 60 horas no se observaron residuos en ningún pH. La presencia de halos de inhibición en las muestras colocadas en cilindro se obtuvieron a partir de las 12 horas postratamiento como se observa en el cuadro 11. Por éste método se determinó residuos hasta las 84 horas y sólo en los pH 6 y 7.5 . Con las muestras obtenidas a las 96 horas posteriores a la última aplicación del medicamento no fueron detectables los residuos en cilindro.

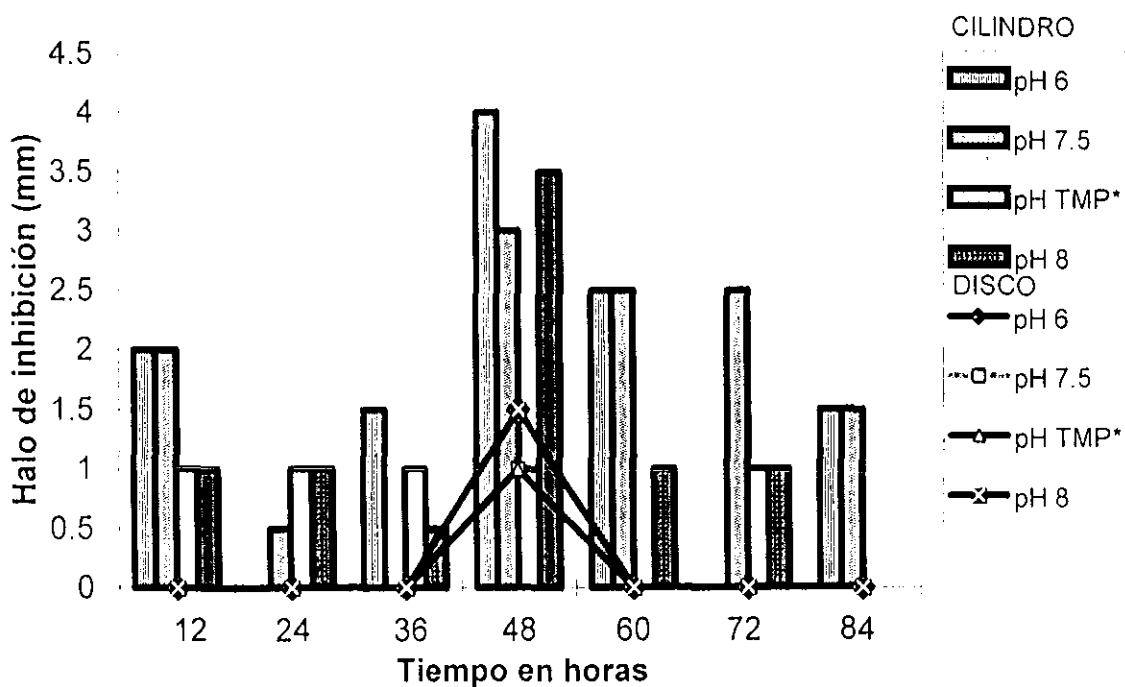
En la gráfica 5 se registra el comportamiento de los halos de inhibición en relación con los pH en disco y cilindro.

**Cuadro 11 . Eliminación en leche de Oxitetraciclina
(método de Tetraplaca) aplicada por vía intravenosa**

Tiempo en horas	Muestra en disco (\bar{x} mm) ¹				Muestra en cilindro (\bar{x} mm) ¹			
	pH				pH			
	6	7.5	TMP ²	8	6	7.5	TMP ²	8
12	0	0	0	0	2	2	1	1
24	0	0	0	0	0	0.5	1	1
36	0	0	0	0	1.5	0	1	0.5
48	0	0	1	1.5	4	3	1	3.5
60	0	0	0	0	2.5	2.5	0	1
72	0	0	0	0	0	2.5	1	1

(\bar{x} mm)¹= Promedio en milímetros

TMP²= Medio de cultivo con pH 7.5 con 0.075 ppm de Trimetoprim



**Gráfica 5. Periodo de eliminación en leche de Oxitetraciclina
(método de Tetraplaca) aplicada por vía intravenosa**

TMP* = pH 7.5 con 0.075 ppm de Trimetoprim

El análisis de varianza mostró una gran diferencia ($p < 0.01$) para el método de tetraplaca con la NOM de muestras obtenidas de vacas con la aplicación del medicamento por vía intrauterina, en relación con los resultados determinados en cilindro y el pH del medio del cultivo. No existió una diferencia significativa ($p > 0.05$) con el medicamento aplicado por vía intravenosa para ambos métodos en disco. Con cilindro sí existió una significancia relevante con el método de tetraplaca que sí determinó la presencia de Oxitetraciclina en comparación con la NOM que no detectó residuos de este medicamento.

SULFATO DE ESTREPTOMICINA CON PENICILINA G PROCAÍNICA:

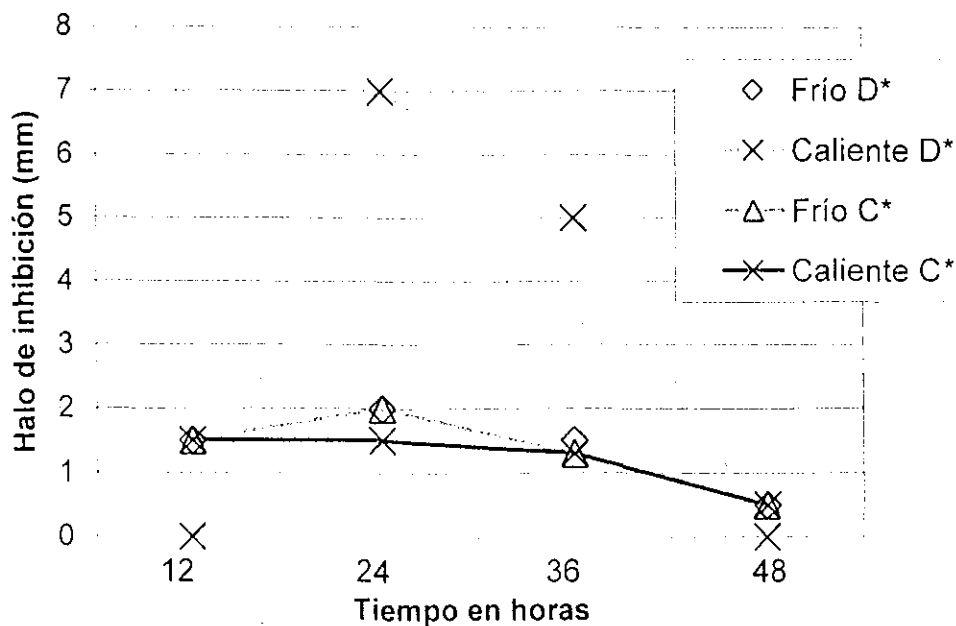
Este medicamento se aplicó a 6 vacas por vía intramuscular en caso de mastitis a una dosis de 6'000,000 de UI de Penicilina G procaínica con 7.9 grs. de Sulfato de Estreptomicina cada 24 horas por 2 días. A una vaca por intervención quirúrgica se le aplicó por la misma vía cada 24 horas una a dosis de 10'000,000 UI de Penicilina con 12.5 grs. de Estreptomicina por 2 días. Con este medicamento se registro un periodo de eliminación de 72 horas.

Con la NOM solamente se detectaron residuos de este medicamento en las muestras frías aplicadas en disco, con las muestras aplicadas en cilindro se obtuvieron halos inhibición bacteriana tanto en frío como en caliente, los promedios de los halos de inhibición se muestran en el Cuadro 12 y gráfica 6 .

Cuadro 12. Eliminación en leche de Sulfato de Estreptomicina con Penicilina G (método de la NOM¹) aplicada por vía intramuscular

Tiempo en horas	Muestra en disco (\bar{x} mm) ²		Muestra en cilindro (\bar{x} mm) ²	
	Frío	Caliente	Frío	Caliente
12	1.5	0	1.5	1.5
24	2	0	2	1.5
36	1.5	0	1.3	1.3
48	0.5	0	0.5	0.5

NOM¹= Norma Oficial Mexicana
 (\bar{x} mm)² = Promedio en milímetros



Gráfica 6. Periodo de eliminación en leche de Sulfato de Estreptomicina con Penicilina G (método de la NOM*) aplicada por vía intramuscular

NOM*: Norma Oficial Mexicana

D* = Disco
C* = Cilindro

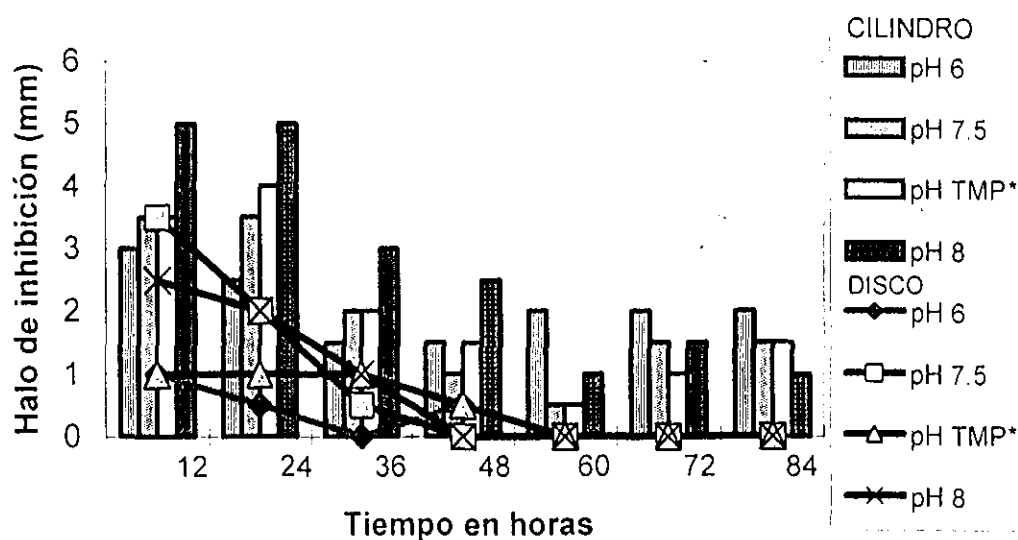
Por el método de 4 placas se detectaron residuos desde las 12 hasta las 84 horas postratamiento. Registrando un pico de mayor excreción a las 24 horas por medio de las muestras en cilindro y solamente se obtuvieron resultados positivos en muestras colocadas en cilindro a las 72 y 84 horas como se observa en el cuadro 13 y gráfica 7.

Cuadro 13. Eliminación en leche de Sulfato de Estreptomicina con Penicilina G (método de Tetraplaca) aplicada por vía intramuscular

Tiempo en horas	Muestra en disco (\bar{x} mm) ¹				Muestra en cilindro (\bar{x} mm) ¹			
	pH				pH			
	6	7.5	TMP ²	8	6	7.5	TMP ²	8
12	1.3	3.5	1	2.5	3	3.5	3.5	5
24	0.5	2	1	2	2.5	3.5	4	5
36	0	0.5	1	1	1.5	2	2	3
48	0.5	0	0.5	0	1.5	1	1.5	2.5
60	0	0	0	0	2	0.5	0.5	1
72	0	0	0	0	2	1.5	1	1.5
84	0	0	0	0	2	1.5	1.5	1

(\bar{x} mm)¹ = Promedio en milímetros

TMP² = Medio de cultivo pH 7.5 con 0.075 ppm de Trimetoprim



Gráfica 7. Periodo de eliminación en leche de Sulfato de Estreptomicina con Penicilina G (método de Tetraplaca) aplicada por vía intramuscular

TMP* = pH 7.5 con 0.075 ppm de

El valor estadístico de los resultados con este tipo de antimicrobiano fue altamente significativo ($p < 0.01$) para la NOM, en relación a la aplicación de la muestra tanto en disco como en cilindro. En comparación con la prueba de tetraplaca los resultados fueron significativos ($p < 0.05$).

SULFONATO DE SULFADIMIDINA CON TRIMETOPRIM:

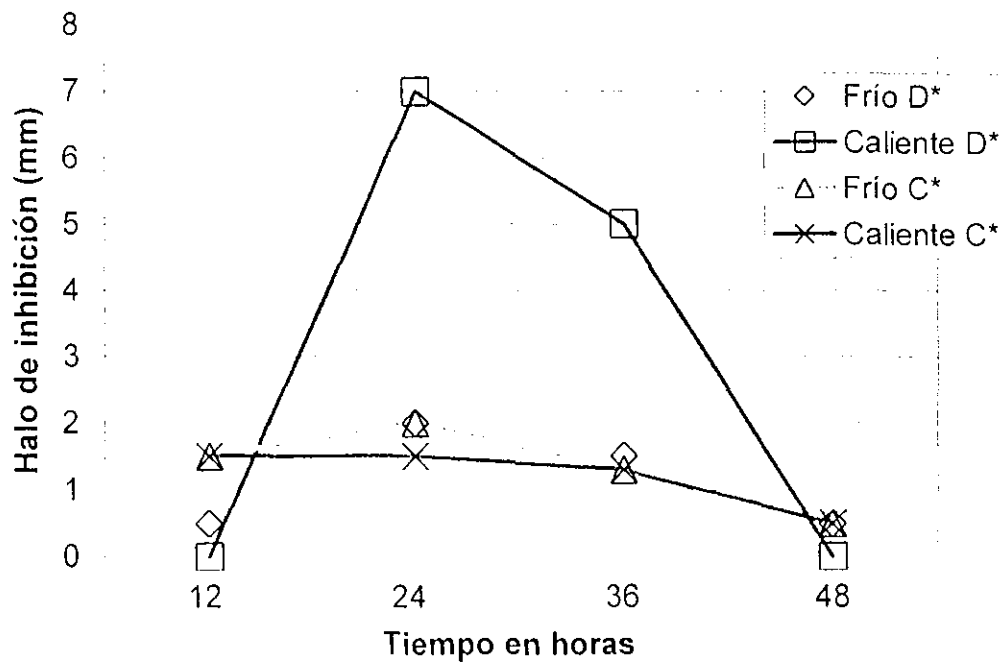
Con este tipo de medicamento la aplicación fue por vía intramuscular para el tratamiento de mastitis y metritis en 2 vacas, a una dosis de 5 grs. con una aplicación cada 24 horas por 2 días. El periodo de eliminación determinado fue de 48 horas por medio de la NOM y de 72 horas por el método de tetraplaca.

Después de la última aplicación del medicamento se registró un pico de mayor excreción en las muestras que se obtuvieron a las 24 horas y a las 48 horas no presentaron halo de inhibición como se observa en el cuadro 14 y gráfica 8.

Cuadro 14. Eliminación en leche de Sulfonato de Sulfadimidina con Trimetoprim (método de la NOM¹) aplicado por vía intramuscular

Tiempo en horas	Muestra en disco (\bar{x} mm) ²		Muestra en cilindro (\bar{x} mm) ²	
	Frío	Caliente	Frío	Caliente
12	0.5	0	10	10
24	3	7	2	1.5
36	1.5	5	1.5	1.5
48	0.5	0	0	0

NOM¹= Norma Oficial Mexicana
 (\bar{x} mm)² = Promedio en milímetros



Gráfica 8. Periodo de eliminación en leche de Sulfonato de Sulfamidina con Trimetoprim (método de la *NOM) aplicado por vía intramuscular

NOM*=Norma Oficial Mexicana

D*=Disco
C*=Cilindro

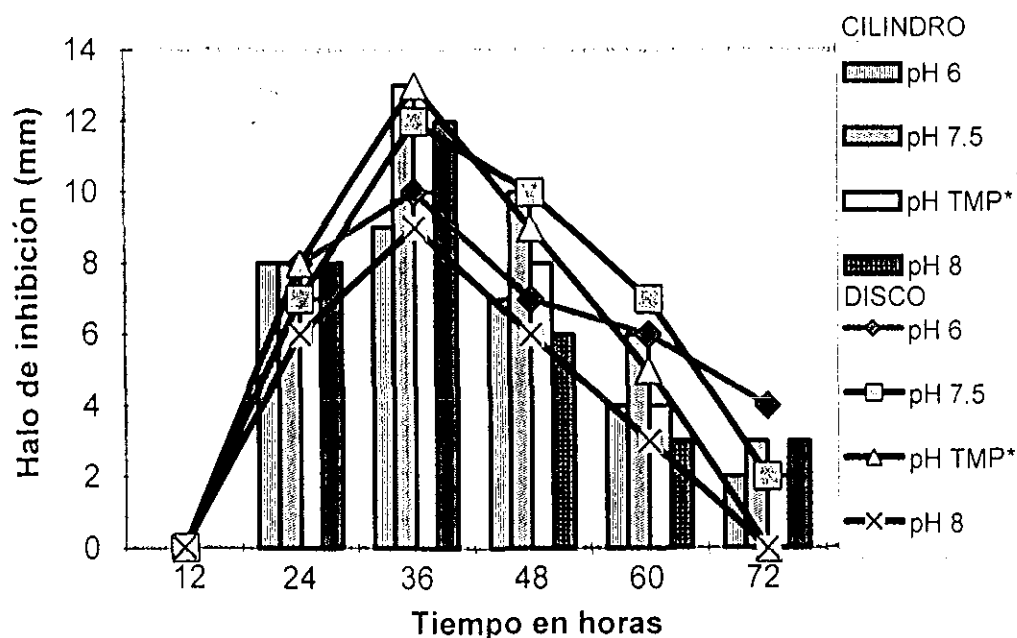
Con el método de tetraplaca las muestras colocadas en disco y cilindro no mostraron a las 12 horas halos de inhibición en ningún pH. Las muestras adquiridas a las 24 horas de la última aplicación del medicamento su eliminación fue más notorio presentando en disco halos desde 6 a 8 mm, en cilindro se observaron halos de 7 y 8 mm en promedio. Se identificó el pico de mayor excreción en leche con las muestras de 36 horas postratamiento, las muestras que obtuvieron a las 84 horas, no presentaron halos de inhibición como se puede observar en el cuadro 15 y la gráfica 9.

Cuadro 15. Eliminación en leche del Sulfonato de Sulfadimidina con Trimetoprim (método de Tetraplaca) aplicado por vía intramuscular.

Tiempo en horas	Muestra en disco (\bar{x} mm) ¹				Muestra en cilindro (\bar{x} mm) ¹			
	pH				pH			
	6	7.5	TMP ²	8	6	7.5	TMP ²	8
12	0	0	0	0	0	0	0	0
24	8	7	8	6	8	8	7	8
36	10	12	13	9	9	13	10	12
48	7	10	8	6	7	10	8	6
60	6	7	5	3	4	6	4	3
72	3	4	2	0	2	3	2	0
84	0	0	0	0	0	0	0	0

(\bar{x} mm)¹ = Promedio en milímetros

TMP² = pH 7.5 con 0.075 ppm de Trimetoprim



Gráfica 9. Periodo de eliminación en leche de Sulfonato de Sulfadimidina con Trimetoprim (método de Tetraplaca) aplicado por vía intramuscular

TMP* = pH 7.5 con adición de 0.075 ppm de

El valor estadístico de los resultados con este medicamento para la prueba de la NOM en comparación con el método de Tetraplaca no existió diferencia significativa ($p>0.05$) en relación de la aplicación de la muestra en disco o cilindro pero si existe una diferencia en relación con el pH ($p<0.05$).

DISCUSION :

La presencia de residuos de antimicrobianos en leche es consecuencia de muchos factores. De particular importancia para las empresas procesadoras de productos lácteos son los antimicrobianos empleados como medicamentos terapéuticos en animales de producción y la frecuencia con que el consumidor podría estar expuesto a los mismos.

La aplicación de diferentes métodos para determinar la presencia de éstos residuos farmacológicos en los alimentos han demostrado que en los mismos procedimientos los resultados varían de un 30 a 100% en relación al grado de la concentración del antimicrobiano en el momento de la toma de muestra y del procedimiento utilizado (FAO/OMS 1996). En este caso los métodos microbiológicos de difusión en agar empleados en este estudio demostraron ser sensibles en la determinación de la presencia de residuos en leche y la variante en el pH del medio de cultivo en el método de Tetraplaca ayuda a orientar al analista el tipo de medicamento que se encuentra en la muestra, también existe una relación significativa en los resultados en la forma de aplicar la muestra en disco o en cilindro.

En el caso del **Monohidrato de Cefalexina** los fabricantes recomiendan un tiempo de eliminación del producto por leche de 84 horas aplicada por vía intramamaria, A través de los resultados obtenidos, el producto presentó un periodo de eliminación de 48 horas en los 2 métodos empleados. Se considera al Monohidrato de Cefalexina con una eficaz difusión en sangre y otros tejidos y es de rápida excreción por leche ya que no atraviesa la barrera de tejido mamario aplicado por vía intramamaria. En registros de periodos oficiales por la F.D.A. recomienda un tiempo de espera de 48 horas coincidiendo con los resultados de este estudio.

Sumano(1996) en México realizó un estudio farmacocinético para determinar el tiempo de eliminación del Monohidrato de Cefalexina por diferentes vías de aplicación, con resultados similares del tiempo de eliminación con este estudio en la aplicación por vía intramamaria con la variante de difusión en agar con *B. cereus*.

La **Oxitetraciclina** se aplicó por las vías intrauterina e intravenosa para los tratamientos de metritis, endometritis y neumonía. La mayoría de los fabricantes de este tipo de producto recomienda un periodo de restricción de 60 horas en nuestro estudio se determinó un tiempo de eliminación de 72 horas. Este tipo de antimicrobiano una vez absorbido sufre un grado considerable de biotransformación en hígado y eliminado en su mayoría por vía renal, pero se ha encontrado en leche en concentraciones mayores del 50% respecto a la identificada en plasma. (Andrew 1997). Se considera que la vía de aplicación intravenosa e intrauterina llevadas a cabo en este estudio influyó a que las muestras mostraran halos de inhibición muy pequeños por considerarse su eliminación por vía renal.

La OMS indica que en leche no deben existir este tipo de residuos por más de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, pero la FDA permite niveles de hasta 300 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. La International Dairy Federation recomienda que para detectar concentraciones entre 200 y 400 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ se utilice la prueba Charm Test II que emplea al *B. stearothermophilus* como bacteria indicadora de residuos en leche. El *B. subtilis* utilizado en este trabajo según la I.D.F. es sensible a 0.10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ obteniendo resultados con halos de inhibición mayores a 1 mm.

El fabricante de **Sulfato de Estreptomicina con Penicilina G sódica** marca un periodo de restricción de 72 horas, en los resultados de este estudio se determinó un tiempo de eliminación igual a lo indicado por el fabricante.

En comparación de los resultados con estudios realizados por diferentes autores, se observó que en este tipo de medicamento se facilita su difusión en medios de cultivo con diferente pH, dada la mezcla aplicada por vía intramuscular así como la inoculación del agar con *B. subtilis* permitiendo mayor sensibilidad por el método de tetraplaca en comparación con la NOM en la cual sólo se maneja el pH 6. En consideración del tiempo de eliminación Sumano (1995) determinó que la estreptomicina tiene un tiempo de retiro que fluctúa entre 4 y 13 ordeños (48-156 horas) así como su pKa de 8.8 que favorece su difusión en tejidos y medios de cultivo que varían su pH de 6 a 8.5 y con una distribución en tejido mamario del 0.5%. No obstante la penicilina tiene registrado un tiempo de eliminación de 48 a 72 horas y su pKa es de 6.6 y su adición al tejido mamario es 4.5 veces mayor que en el plasma. Nouws (1999) establece que la sensibilidad máxima de residuos de este tipo de antimicrobianos en leche es utilizando medios de cultivo inoculados con *Bacillus subtilis*. La Federación Internacional de la leche (1991) afirma que el *B.subtilis* puede detectar la presencia de penicilina en leche a partir de 0.006 U.I./ml. Por lo tanto los periodos de eliminación registrados en este estudio son válidos para fijar un tiempo de retiro más cercano a las condiciones de nuestra región.

El periodo de restricción de **Sulfonato de Sulfamidina con Trimetoprim** administrado por vía Intramuscular marcado por el laboratorio fabricante es de 48 horas. En este estudio se determinó un tiempo de eliminación de 60 horas, pero en los resultados mostraron que existe mayor sensibilidad por la prueba de tetraplaca en los pH 7.5 y 7.5 con TMP registrando mayores halos de inhibición en comparación con la NOM que mostró un promedio menor de inhibición. Diferentes estudios de residuos de este medicamento en leche permiten visualizar las características propias de la Sulfadimidina en combinación con TMP que ayuda a la desaparición rápida de residuos tisulares, siendo la vía láctea una forma de eliminación con presencia de residuos en niveles mas altos que en otros tipos de antimicrobianos.

Bugyei 1995 menciona que la aplicación de este tipo de medicamento para el tratamiento de mastitis va en aumento día con día y concluye que existe una proporción en equilibrio entre leche y plasma de 0.50:1 con fijación de proteínas plasmáticas de un 70% de aquí la importancia de su presencia en la leche. Sumano y Ocampo (1996) indican que en términos generales las sulfonamidas poseen un pH de 7 a 12.5, en el caso particular de la Sulfamidina tiene un pH neutro para facilitar la cinética del mismo en el organismo y en combinación con TMP ayuda a la desaparición rápida de residuos tisulares. Registrando en este estudio la presencia de residuos en leche con halos de 7 a 14 mm en el pico de mayor excreción.

Argawal(1992) menciona que en E.U. los residuos en leche no deben exceder de 10 ppb y que para determinar esta concentración se recomienda la aplicación de técnicas de análisis más exactos como lo es la Cromatografía de líquidos (HPLC).

Korskud 1988 y Zeng 1998 indican que las pruebas microbiológicas de difusión en agar no presentan resultados que conciernen a residuos en concentraciones mínimas en especial con las sulfonamidas, en donde el *B. subtilis* no se tiene como microorganismo de referencia para detectar este tipo de residuos en leche. En este estudio se observó que la sensibilidad del *B. subtilis* en pH 6 y pH 8 fue mínimo en comparación con el pH 7.5 y con TMP favoreciendo éste último a la difusión de la muestras en disco y cilindro.

Existen investigadores que han realizado estudios para determinar el tiempo de eliminación en leche utilizando métodos diferentes para la determinación cuantitativa y cualitativa del antimicrobiano en estudio. Por ejemplo Cullor(1994) observó por medio de 5 tests kits, que los resultados variaban de acuerdo al tipo de microorganismo utilizado, concluyendo que es difícil determinar mediante este tipo de pruebas el tiempo de eliminación de antimicrobianos en leche. Así también

Nouws 1999 aplicó un sistema múltiple de 7 placas con diferentes pH y microorganismo para poder determinar límites mínimos de residuos en leche indicando que el tamaño del halo de inhibición varía de acuerdo al tipo de antimicrobiano así como del microorganismo de prueba.

Basándose en los resultados de este estudio se puede concluir que la prueba microbiológica de difusión en agar es adecuada para la determinación de la presencia de residuos de antimicrobianos en leche siendo el *B. subtilis* un microorganismo sensible a una gran gama de medicamentos antibacterianos eliminados por vía láctea.

CONCLUSIONES :

- 1.- Los tiempos de eliminación encontrados del Monohidrato de Cefalexina, Oxitetraciclina y de Sulfonato de Sulfadimidina con Trimetoprim no coincidieron con lo marcado por el fabricante
- 2.- Mediante el método de tetraplaca con los diferentes pH se determinó la presencia de residuos con halos de inhibición mayores de 1 mm de la Oxitetraciclina aplicada por vía intravenosa en comparación con la Norma Oficial Mexicana-F-425-83 "DETERMINACIÓN DE INHIBIDORES EN LECHE FLUIDA".
- 3.- El procesamiento de las muestras para la detección de residuos de antimicrobianos en leche a través de la técnica en cilindro favorece la difusión sobre el medio de cultivo y la aparición de halos de inhibición más claros en ambos métodos.
- 4.- Es importante realizar estudios farmacocinéticos para establecer periodos de restricción oficiales en México en base a las características de individuos y de nuestro medio ambiente para evitar dañar la economía de los productores y la Salud Pública.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Amézquita R.H., L. Barcena, A. Figueroa, J.L. Mojarro, y G. Saad. 1994. *Investigación documental sobre los periodos de retiro de medicamentos con carácter residual disponibles comercialmente en México y que son usados en animales proveedores de alimentos al hombre*. Tesis profesional Universidad de Guadalajara, México. p.87
- 2.- Andrew S.M., R. A. Frobish, M. J. Paape and L. J. Maturin, 1997. *Evaluation of selected antibiotic residue screening tests for milk from individual cow and examination of factors that affect the probability of false positive outcomes*. Journal Dairy Science. 80 (11):3050-3057
- 3.- Argawal V.K. 1992. *A high performance liquid chromatographic method for the determination of nine sulfonamides in milk* In : Analysis of antibiotic/drug residues in food products of animal origin Edit. Plenum New York, i.e. pp 165 – 172
- 4.- Briones V., Goyache J., Moreno M.A. y Domínguez L. 1999 *Sanidad animal, salud pública y medio ambiente*. Veterinaria Año 11 N° 43 Febrero – Marzo. Editada por el Colegio Oficial de Veterinarios de Madrid. pp. 18 - 23
- 5.- Britt J.S., Carson M.C., von Bredow J.D. and Condon R.J. 1999. *Antibiotic residues milk samples obtained from cows after treatment for papillomatous digital dermatitis*. Journal American Veterinarian Association. Vol. 215 N° 6 September 15 pp. 833-836
- 6.-Bundesanzeiger. 1996. "*Hemmstoffe in muskulatur und Niere (Dreiplattentest mit TMP)*" im: Allgemeine verwaltungsvorschrift über die Durchführung der amtlichen Untersuchungen nach dem Fleischhygienegesetz(VwVFIHG). i.e. pp 13-14. vom. 11 Dezember.
- 7.- Chavez M.L. 1998. *Monitoreo de inhibidores microbianos en sangre de pollo de engorda sacrificados en el rastro municipal de Guadalajara*. Tesis profesional nivel Licenciatura de la Div. de Cs. Veterinarias del CUCBA, UDG México
- 8.- Coleman W.W. 1995. *Animal food safety and dairy regulations, Now and in the future: from farm to fork, a state perspective*. Journal Dairy Science Vol. 78 N° 5 pp. 1204-1206
- 9.- Cullor, J.S. 1994. *Testing the tests intended to detected antibiotic residues in milk*. Veterinary Medicine vol. 89 N° 5 pp
- 10.- Food and Agriculture Organization/ World Health Organization 1991. *Evaluación de ciertos residuos de fármacos de uso veterinario en los alimentos*.
38° Informe del Comité mixto FAO/OMS de expertos en aditivos alimentarios. Ginebra, Suiza.

- 11.- Food and Agriculture Organization/ World Health Organization 1996. *Residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos* Codex Alimentarius Vol. 3 2a. Edición Italia p. 74
- 12.- Food and Agriculture Organization/ World Health Organization. 1996. *Evaluación de residuos de ciertos fármacos de uso veterinario en los alimentos*. 45º Informe del Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios. Ginebra, Suiza. Pp. 5 - 49
- 13.- Food and Drug Administration 1989. *Drug use guide: dairy cattle and calves*. Center for Veterinary Medicine CVM.MEMO-27 U.S.A.
- 14.- Food and Drug Administration 1993. *Food Animal Residue Avoidance Databank (FARAD)*. Appendix 5. Center for Veterinary Medicine U.S.A.
- 15.- Guerrero G.J. 1997. *Detección de residuos de antimicrobianos en tejidos de bovinos y cerdos por el método de triplaca*. Tesis profesional nivel Licenciatura de la Div. de Cs. Veterinarias del CUCBA, UDG México
- 16.- Gustafson R.H. and Bowman R.E. 1997. *Antibiotic use in animal agriculture*. Journal of Applied Microbiology. 83 (5): 531-541
- 17.- Hapke H-J. 1997. *"Presencia de compuestos indeseables en alimentos de origen animal"* In Memorias: Simposium- Significado sanitario de residuos químicos potencialmente tóxicos en alimentos. Universidad de Guadalajara Diciembre 2 pp. 12 - 21
- 18.- Heeschen W.H. and Blüthgen, 1991. *Veterinary drugs and pharmacologically active compounds* In: Monograph on residues and contaminants in milk products. Edited by International Dairy Federation i.e. pp. 16 - 32 Belgian
- 19.- Herrick J.B. 1997. *Drugs and biologics are not substitute for effective management by food animal veterinarians*. Journal American Veterinarian Association. May 15 210 (10):1419 - 1420
- 20.- Hoog R. A; White, A. J. and Jackman R. 1992 *"Prolonged excretion by heifers of an inappropriately used intramammary antibiotic"* Veterinary Record 130(18) pp. 402 403
- 21.- Infante M.F. 1999. *"Los residuos de antibióticos, su importancia en la producción lechera y en salud pública"* in Memorias: Congreso Panamericano de Control de Mastitis y Calidad de la Leche, Mérida, Yucatán, México Marzo 23 al 27 de 1998 pp. 461- 463
- 22.- International Dairy Federation 1991. *Detection and confirmation of inhibitors in milk and milk products in: Bulletin N° 258* pp. 4-5 2nd. Edition Brussels, Belgium.

- 23.- Korsrud G.O. and Macnell J.D. 1988. *Evaluation of the swab test on premises, the calf antibiotic and sulfa test, and microbial inhibitor test with standard solutions of 22 antibiotics.* Journal Food Protection. 51(1):43-46
- 24.- McEwen S.A., A. H. Meek and W. D. Black 1991. *A dairy farm survey of antibiotic treatment practices, residues control methods and association with inhibitors in milk.* Journal of Dairy Science. 54(6):454 - 459
- 25.- Mitchell J.M., M. W. Griffith, S. A. McEwen, W. B. McNab and A. J. Yee. 1998. *Antimicrobial drug residues in milk and meat: Causes, Concerns, Prevalence, Regulations, Tests, and Test Performance.* Journal of Food Protection. 61(6):742-756
- 26.- Musser J.M.B. and Anderson K.L. 1999. *Using drug residue screening tests to investigate antibiotic contamination of milk.* Veterinary Medicine. 94(5):474 - 479
- 27.- Nouws J.; van Egmond H; Smulders I.; Loeffen G.; Schouten J. and Stegeman H. 1999 *Amicrobiological assay system for assessment of raw milk exceeding EU maximum residue levels* International Dairy Journal, February. 9(2):85 – 90
- 28.- Owens W.E., C. H. Ray, J. L. Watts and R. J. Yancey. 1997 *Comparison of Success of Antibiotic Therapy During Lactation and Results of Antimicrobial Susceptibility Test for Bovine Mastitis.* Journal of Dairy Science. 80(2):313-317
- 29.- Payne M.A., L. D. Weaver, 1993. *The veterinarian's growing role in food quality assurance programs on dairies.* Veterinary Medicine. 88(5):458 - 465
- 30.- Ramírez A. A., 1994. *Aspectos regulatorios en la evaluación toxicológica de residuos farmacológicos en alimentos de origen animal.* Ciencia Animal N° 7 abril pp. 25-30
- 31.- Ramos C. R. 1992 *Estudio sobre la presencia de residuos de antibióticos en carne procedente de equino y destinada al consumo humano.* Tesis profesional nivel Licenciatura de la Div. de Cs. Veterinarias del CUCBA, UDG México
- 32.- Sánchez R. A. 2000. *Frecuencia de inhibidores microbianos en músculo y reñón de bovino.* Tesis profesional nivel Licenciatura de la Div. de Cs. Veterinarias del CUCBA, UDG México
- 33.- Secretaria de Comercio y Fomento Industrial 1983 *"Norma Oficial Mexicana-F-425-83-Determinación de inhibidores microbianos en leche fluida"* Diario Oficial de la Federación 17 Julio 1983 México
- 34.- Secretaría de Salud, 1999. *Reglamento de control sanitario de productos y servicios.* Diario Oficial de la Federación del 9 de Agosto de 1999 2ª Sección pp. 1 – 96 México

- 35.- Sischo W. M., 1996. *Quality milk and tests for antibiotic residues in Symposium: Drug residue avoidance: The issue of testing*. Journal Dairy Science. 79(6):1065- 1073
- 36.- Soriano F., P. García-Crobeira, C. Ponte, R. Fernández-Roblas e I. Gadea, 1996. *Correlation of pharmacodynamic parameters of five β -lactam antibiotics with therapeutic efficacies in animal model*. American Society for Microbiology. 40(12):2686 - 2690
- 37.- Sumano L. H. y G. W. Brumbaugh, 1995. *Farmacología clínica de los aminoglucósidos y los aminociclitolos en medicina veterinaria*. Veterinaria México. 26(1):1-11
- 38.- Sumano L. H., C. L. Ocampo, 1996. *Cinética de eliminación de residuos de Cefalexil® en suero y leche de vacas afectadas de mastitis clínica*. División de estudios de posgrado e investigación U.N.A.M. Reporte Técnico México
- 39.- Sundolf S.F. 1998. *Legal and responsible drug use in the cattle industry: Extra-label use*. Veterinary Medicine. 93(7):673 – 680
- 40.- Sundolf S.F. 1998. *Legal and responsible drug use in the cattle industry: The animal drug availability act*. Veterinary Medicine. 93(7):681 - 684
- 41.- Thornsberry C., P. J. Burton, C. Yee, J. L. Watts and R. J. Yancey, 1997. *The activity of a combination of penicillin and novobiocin against bovine mastitis pathogens: Development of Diffusion test*. Journal Dairy Science. 80(2):413 - 421
- 42.- Tollefson L., Altekruze S.F. and Potter M.E. 1997. *Therapeutic antibiotics in animal feeds and antibiotic resistance*. Rev. Scientific tech. Off. International Epizooties. 16(2):709 - 715
- 43.- Torres C. R. 1995 *Efecto de concentraciones mínimas de antibióticos sobre el desarrollo de Streptococcus thermophilus y Lactobacillus bulgaricus en la fabricación de yogurt*. Tesis profesional nivel Licenciatura de la Div. de Cs. Veterinarias del CUCBA, UDG México
- 44.- Uribe R. M. 1993 *Identificación de antibióticos residuales en leche de vaca destinada para consumo humano*. Tesis profesional nivel Licenciatura de la Div. de Cs. Veterinarias del CUCBA, UDG México
- 45.- Van-Eenennam A.L. and J. S. Cullor, 1993. *Evaluation of milk antibiotic residue screening tests in cattle with naturally occurring clinical mastitis*. Journal of Dairy Science. 76(10):13041-3053
- 46.- Wolter, W., Kloppert, B. y Zschöck, M. 1999 *La mastitis en bovinos* In : Memorias del curso México – Alemania de Mastitis en bovinos 14 al 23 de abril Depto. de Salud Pública del CUCBA, UDG México . pp. 50 - 51

46.- World Health Organization, 1990. *Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food*. Geneva International Programme on Chemical Safety pp.79-93

47. Zeng S.S., Hart S., Escobar E.N. and Tesfai K. 1998. *Validations of antibiotic residues tests for dairy goats*. 61(3):344 - 349