

REPORTE FINAL DE ESTUDIO (RF)

1. Título

Evaluación de la Residualidad en Leche de una Infusión Antibiótica Intrauterina sobre la base de Cefalexina, Neomicina, Cloxacilina y Vitamina A (Metricef 3®) en vacas lecheras del distrito de Pachacamac, departamento de Lima.

2. Número de Ensayo

NN-2010

3. Tipo de Estudio

Trabajo de Investigación

4. Objetivo General

Determinar el tiempo de residualidad en leche de una Infusión Antibiótica Intrauterina sobre la base de Cefalexina, Neomicina, Cloxacilina y Vitamina A (Metri-Cef 3®) en vacas lecheras en lactación.

5. Investigador(es)

5.1. Investigador Principal

Arnaldo Alvarado, MV del Área de Microbiología Clínica y Pruebas Especiales del Laboratorio de Patología clínica de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

5.2. Investigador(es) Colaborador(es)

Fabián Rodríguez, MV del Área de Investigación en Salud Animal – Laboratorio Agroveter Market Animal Health.

6. Sponsor

Agroveter Market S.A.

Dirección: Av. Canadá 3792-3798 San Luis, Lima 30, Perú.

Teléfono: (51) (1) 435 2323

6.1. Equipo de Trabajo

Jose Tang Ploog – Sub Gerente de Investigación y Desarrollo.

7. Lugar de Estudio

El estudio se realizó en el Establo Casablanca en el distrito de Pachacamac, departamento de Lima.

8. Antecedentes y Justificación

El uso de antibióticos es sin lugar a dudas una de las principales herramientas en el control y erradicación de numerosas enfermedades infecciosas de origen bacteriano en animales de producción y compañía. Una vez producido el diagnóstico de una afección y establecido el tratamiento, además de seguir el curso clínico de los animales afectados se debe prestar especial atención a los periodos de descarte de leche para poder enviar al mercado la leche con niveles de inhibidores por debajo de los máximos residuales permitidos.

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

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

En el caso particular de la leche, al riesgo toxicológico se suma el riesgo tecnológico, es decir el efecto que las concentraciones de antibióticos pueden tener sobre los procesos fermentativos dirigidos a la obtención de productos de alto valor agregado. Es importante destacar, que estos residuos causan graves daños en la industria lechera, ya que la elaboración de derivados lácteos como queso y yogurt necesitan el desarrollo de la flora ácido láctico. Esta flora, es inhibida por la presencia de concentraciones pequeñas de antibióticos, razón por la cual las industrias realizan rutinariamente un control interno, para separar la leche ausente de estos residuos y destinarla a la elaboración de estos productos.

Por ello en la actualidad se debe conocer las concentraciones máximas permitidas, y como herramienta para su detección existen diversos métodos para estimar las concentraciones máximas permitidas en la leche. Ahora se encuentran técnicas como la de tipo ensayo de receptor de Beta s.t.a.r. (UCB-Bioproducts, Bélgica), la técnica de ensayo de unión a receptor ligado a enzima de Snap (IDEXX Laboratories INC., EEUU), técnicas microbiológicas como la de CH ATK Single Test P&S (Copan Italia), Charm Farm Test Vial (Charm Sciences Inc., EEUU) y el Test cuali o Delvotest® SP – NT.

Estas técnicas detectan al antimicrobiano por debajo del límite de tolerancia fijada por FDA, USDA. Los niveles de detección para Cloxacilina, Neomicina y Cefalosporinas son 20, 100 – 200 y 25 - 50 partes por billon (ppb) respectivamente.

Metri-Cef 3® está indicado para el tratamiento y la prevención de las metritis (clínica y subclínica) y piometra de bovinos, causadas por gérmenes sensibles a alguno de los antibióticos de la fórmula. La asociación de sus tres antibióticos le otorga una efectividad completa contra las bacterias causantes de problemas infecciosos en el útero:

Cefalexina: su efectividad es inmediata, ejerciendo su acción durante las primeras 24 horas de aplicado el producto. Elimina la primera barrera bacteriana. Es activo contra la mayoría de las bacterias Gram positivas (entre ellas los estafilococos) y algunas Gram negativas, incluyendo E.coli, Proteus; Klebsiella, salmonella, Shigella y Enterobacter, además de los estafilococos penicilinas positivos, sin embargo no posee actividad contra Enterobacter spp.,

P.aeruginosa y *Serratia* spp, entre otros. La resistencia adquirida se presenta en bacterias gramnegativas y es de particular importancia en las Enterobacterias.

Neomicina Sulfato: Asociada al excipiente de larga duración presente en la fórmula, extiende su acción hasta por 3 semanas. La neomicina es el antibiótico más utilizado en combinaciones de drogas debido a su amplio espectro antibacteriano. Su actividad bactericida abarca un gran número de bacterias Gramnegativas, incluyendo *E.coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus* sp., *Enterobacter* sp., *Pasteurella*, *Serratia* sp., *Neisseria* sp., *Proteus* sp. *Salmonella* spp, *Shigella* spp, y *Pseudomona aeruginosa* y su espectro abarca también un número reducido de bacterias Gram positivas como el *Staphylococcus aureus*. La resistencia mediada por plásmidos ocurre mediante una variedad de enzimas. Tal resistencia, la cual a menudo es múltiple, es relativamente común en los comensales y patógenos entéricos pero menos frecuente entre otros patógenos oportunistas. La resistencia por mutación cromosomal carece de importancia.

Cloxacilina Benzatínica: Su estructura química la hace estable, impidiendo el acceso de enzimas de núcleo B-Lactámico. Su acción es contra bacterias Gram positivas (tales como *Streptococos*, *Estafilococos*, algunas *Corynebacterias*, *Enrysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium* spp, *Bacillus anthracis*), pero también contra algunos cocos Gramnegativos, *Leptospira canicola*, *Campylobacter foetus* y *Actinomyces*.

Además, *Metri-Cef 3®* contiene Vitamina A, que funciona como regenerador epitelial. La adición de Vitamina A, reduce las consecuencias del proceso infeccioso y participa manteniendo la integridad del tejido.

9. Fecha de Estudio y duración

El estudio se llevó a cabo del 3 de Febrero al 6 de Febrero del 2010, con una duración total de 4 días.

10. Materiales y Métodos

10.1. Diseño experimental

Se seleccionaron dos grupos de trabajo: Grupo A (Tratamiento): 10 vacas lecheras con metritis. Grupo B (Control): 10 vacas lecheras sin tratamiento, todas en un promedio de peso de 600 Kg.

En el grupo A y grupo B se tomaron muestras de leche que contengan una mezcla de los cuatro cuartos de cada vaca, previos a la aplicación del producto para descartar la adición de otros antibióticos o tratamientos previos, lo cual se consideró como la muestra de hora cero (00 h).

En el Grupo A se aplicará mediante una pipeta de inseminación un tubo intrauterino de 30 ml de *Metri-Cef 3®* por vaca.

Una vez aplicado el producto se tomaron muestras de leche de ambos grupos a las 12, 24, 36, 48, 60 y 72 horas que contengan una mezcla de los cuatro cuartos de cada vaca.

Se trabajó con el Kit *Devotest SP – NT* de acuerdo con la metodología descrita por el fabricante.

- 10.2. Tamaño de muestra
Se trabajó con un total de 20 animales.
- 10.3. Selección de animales e identificación
Se seleccionaron 20 vacas lecheras con presencia clínica de metritis.
- 10.4. Manejo de los animales experimentales
Los animales recibieron una dieta especialmente formulada para sus necesidades productivas, y se les brindó agua ad libitum.
- 10.5. Disposición final de animales
Luego del experimento los animales continuaron con su ciclo productivo normal.
- 10.6. Tratamiento
El PVI es una fórmula comercial a base de Cefalexina monohidrato (600 mg), Neomicina sulfato (1.02 g), Cloxacilina benzatínica (1.50 g), Vitamina A (30,000 UI) en 30 mL de solución.
- 10.7. Procedimientos de estudio
El método Test cuali o Delvotest® SP - NT es una prueba de difusión estándar para la detección de los residuos de sustancias antibacterianas (tales como antibióticos y sulfonamidas). La prueba consiste de ampollitas que contienen al medio sólido agar sembrado de un número estandarizado de las esporas de *Bacillus stearothermophilus* var. *Calidolactis*, junto con nutrientes requeridos para el crecimiento y un antifolate trimethoprim. El medio es coloreado en púrpura por el indicador de pH púrpura de bromocresol.

La sensibilidad de Delvotest® SP-NT dada en la hoja de especificación de este producto, aparte de las sensibilidades especificadas para la Penicilina G y Sulfadiazina, muestra los rangos de sensibilidad para otros antibióticos y sustancias inhibitorias que pueden ser detectados, tales como aquellos definidos por el Nivel Máximo de Residuo (MRL). La tabla 1, da una visión de los niveles de detección de Delvotest SP-NT para residuos de diferentes antibióticos y sulfonamidas. El Nivel de detección se refiere a la concentración más baja en la cual una droga es todavía detectada por la prueba, al tiempo control o al tiempo de lectura fijo de 3 horas.

Tabla 1: Datos indicativos sobre el nivel de detección con Delvotest® SP - NT en ppb (partes por billón o ng/ml) en la leche bovina cruda mezclada. Las drogas enlistadas son una selección de la muestra del espectro de detección.

| Droga | Nivel de detección a tiempo de control (ppb) | Nivel de detección Lectura a 3 horas (ppb) |
|------------------------|--|--|
| β-lactams | | |
| penicilina | 1 – 2 | 2 – 3 |
| ampicilina | 4 | 6 – 7 |
| amoxicilina | 2 – 3 | 3 – 5 |
| ceftiofur | 25 – 50 | 50 – 100 |
| cefapirina | 4 – 6 | 6 – 8 |
| cloxacilina | 20 | 20 – 30 |
| dicloxacilina | 10 | 10 – 20 |
| oxacilina | 10 | 10 |
| Sulfonamidas | | |
| sulfadiazina | 25 – 50 | 100 – 150 |
| sulfametazina | 25 – 100 | 100 – 250 |
| Tetraciclinas | | |
| tetraciclina | 250 – 500 | 800 |
| oxytetraciclina | 250 – 500 | 800 |
| Macrolidas | | |
| Tilosina | 30 | 50 |
| Spiramicina | 400 -600 | 800 – 1000 |
| Eritromicina | 40 – 80 | 200 |
| Otras | | |
| Trimetoprim | 50 -100 | 200 – 300 |
| Dapsona | 0.5 – 1 | 1 – 2.5 |
| Aminoglicosidos | | |
| Gentamicina | 50 | 200 |
| Neomicina | 100 – 200 | 300 - 600 |

Las muestras de leche que están libres de sustancias antibacterianas o las que contienen por debajo de niveles especificados, cuando se les hace la prueba añadiendo 0,1 mL de leche e incubadas a 64°C permite la germinación y el crecimiento de la bacteria. Esto conducirá a un cambio en color del indicador de púrpura a amarillo. Cuando la muestra de leche contiene sustancias antibacterianas por encima de la sensibilidad de la prueba, el crecimiento es inhibido y como resultado el color del agar permanece púrpura.

Esta técnica detecta al antimicrobiano por debajo del límite de tolerancia fijada por FDA, USDA. Los niveles de detección para Cloxacilina, Neomicina y Cefalosporinas son 20, 100 – 200 y 25 - 50 partes por billon (ppb) respectivamente.

10.8. Métodos estadísticos

Se usó la estadística descriptiva para la presentación de los resultados.

11. Resultados

CUADRO 1: Resultados de muestras de leche con kit Delvotest SP- NT del grupo tratado con Metri-Cef 3[®]

GRUPO A (TRATADO)

| VACA | 00 h 03/02 (T) | 12 h 04/02 (M) | 24 h 04/02 (T) | 36 h 05/02 (M) | 48 h 05/02 (T) | 60 h 06/02 (M) | 72 h 06/02 (T) |
|--------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| LINDA | - | - | - | - | - | - | - |
| NITA | - | - | - | - | - | - | - |
| LULU | - | + | - | - | - | - | - |
| GLADIS | - | - | - | - | - | - | - |
| LIDIA | - | - | - | - | - | - | - |
| 11 | - | - | - | - | - | - | - |
| 12 | - | - | - | - | - | - | - |
| 13 | - | + | - | - | - | - | - |
| 14 | - | - | - | - | - | - | - |
| 15 | - | - | - | - | - | - | - |

CUADRO 2: Resultados de muestras de leche con kit Delvotest SP- NT del grupo no tratado.

GRUPO B (CONTROL)

| VACA | 00 h 03/02 (T) | 12 h 04/02 (M) | 24 h 04/02 (T) | 36 h 05/02 (M) | 48 h 05/02 (T) | 60 h 06/02 (M) | 72 h 06/02 (T) |
|------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 1 | - | - | - | - | - | - | - |
| 2 | - | - | - | - | - | - | - |
| 3 | - | - | - | - | - | + | - |
| 4 | - | - | - | - | - | - | - |
| 5 | - | - | - | - | - | - | - |
| 6 | - | - | - | - | - | - | - |
| 7 | - | - | - | - | - | - | - |
| 8 | - | - | - | - | - | - | - |
| 9 | - | - | - | - | - | - | - |
| 10 | - | - | - | - | - | - | - |

Leyenda: - : Negativo a presencia de antibiótico.

+ : Positivo a presencia de antibiótico.

h : Horas

M: Mañana

T : Tarde

Los resultados mostrados en el Cuadro 1 del Grupo A (Tratado) muestra que todas las vacas, se encuentran negativas a presencia de antibióticos en leche desde el primer muestreo (12 h) post-tratamiento y permanecen negativas hasta el muestreo final que fue hasta las 72 horas. Las excepciones a estos resultados fueron las vacas Lulú y N° 3, que tuvieron resultados positivos al primer muestreo (12 h), los cuales se pueden considerar que se tratarían de reacciones cruzadas o probables contaminaciones con desinfectantes a la hora de la toma de muestras, ya que estas vacas en el muestreo pre-tratamiento (00 h) estuvieron negativas y considerando la alta sensibilidad de la prueba es muy fácil la detección elementos extraños a los buscados en la prueba. La interpretación de un resultado negativo a residuos de antibióticos es que, las muestras tienen niveles de concentración que están por debajo de los niveles de detección, siendo el caso para Cefalexina la cual se encuentra por debajo de las 50 a 100 ppb, para Cloxacilina 20 a 30 ppb, y, para Neomicina 300 a 600 ppb respectivamente (Tabla 1).

En el Cuadro 2 de los resultados del Grupo B (Control) sin tratamiento, se observa que todas las vacas se mostraron negativas a residuos de antibióticos en leche, tanto en el muestreo de hora cero (00 h) como en los siguientes muestreos, hasta el muestreo final de 72 horas; lo cual demuestra que todas las vacas utilizadas en el experimento en ambos grupos, se mantuvieron durante el periodo de prueba, sin tener contacto con ninguna fuente de antimicrobianos o desinfectante que hubieran podido influenciar en los resultados obtenidos.

12. Conclusiones

Se concluye que la residualidad en leche de una Infusión Antibiótica Intrauterina sobre la base de Cefalexina, Neomicina, Cloxacilina y Vitamina A (Metri-Cef 3®) en vacas lecheras en lactación es nula; dado a que, los resultados como negativos por el método utilizado en el presente trabajo se interpretan como valores de antibióticos por debajo de los niveles de detección y estos a su vez son valores considerados menores al LMR.

13. Autores del RF

José Tang Ploog

Médico Veterinario Sub-Gerente de Investigación y Desarrollo de Agrov Market S.A.

14. Referencias Bibliográficas

Manual Merck de Veterinaria. Quinta Edición. Océano Grupo Editorial. España. 2000.

Prescott, John F.; Baggot Desmond. Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine. Second edition.1993. 557-558

Sumano, Ocampo. Farmacología Veterinaria. Segunda Edición.1998

<http://www.capraispana.com/enfermedades/mastitis/secado.htm>. El tratamiento y prevención de mastitis durante el período de secado.

<http://www.infolactea.com/descargas/biblioteca/290.pdf>. Calidad de leche y manejo sanitario de la vaca seca. Pamela Ruegg. University of Wisconsin.

http://www.westfalia.com/mx/es/what_is_new/news/2007/dryoffnoticia.aspx. Control de mastitis en vacas en seca. GEA Farm Technologies.

15. Anexos



Introducción de pajilla de Metricef 3



Pajilla con jeringa de Metricef 3



Introducción de la suspensión



Metricef 3



Toma de muestra de leche



Muestra de leche



Retiro de leche con pipeta calibrada



Incubación de muestras de leche con el kit Delvotest SP-NT



Toma de resultados luego de la incubación



Verificación de resultados luego de la incubación