

REPORTE FINAL DE ESTUDIO DE RESIDUALIDAD

1. Título

Detección de Residuos de una suspensión antibiótica comercial en base a Ceftiofur clorhidrato (Ceja-Ject®) en leche vacuna.

2. Número de Ensayo

NN- 600-10

3. Investigador Principal

Dra. Olga Li - Médico Veterinario del Laboratorio de Patología clínica de la FMV-UNMSM.

4. Sponsor

Agrovet Market S.A.

4.1. Equipo de Trabajo

Jose Tang Ploog – Sub Gerente de Investigación y Desarrollo.

5. Lugar de Estudio

El estudio comprendió dos fases, la fase de campo y la fase de laboratorio. La fase de campo se realizó en un establo lechero de la ciudad de Huancayo, ubicada en la sierra central del Perú, sobre los 3000 msnm. Por su parte, el análisis de laboratorio se realizó en las instalaciones del laboratorio de Patología clínica de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

6. Objetivo General

Determinar el tiempo de residualidad de una suspensión antibiótica comercial en base a Ceftiofur en leche vacuna.

7. Antecedentes y Justificación

La leche es uno de los alimentos más importantes en la alimentación humana debido a su alto valor nutricional, el cual debe ir acompañado de su inocuidad desde su producción hasta el consumo, con el propósito de evitar que se presenten contaminantes físicos, químicos y biológicos en cantidades tales que puedan afectar la salud de los consumidores (Caballero, 2008).

Los antibióticos constituyen uno de los principales contaminantes de la leche (Llanos, 1991) cuando no se aplica el período de retiro necesario. Éstos, son ampliamente usados en la industria ganadera como agentes terapéuticos, promotores de crecimiento y profilácticos (Sawant et al., 2005), resultando en la excreción de residuos a través de los fluidos o secreciones corporales como la orina y la leche, así como su acumulación en tejidos corporales (Adesiyun et al., 1997).

La presencia de antibióticos en la leche constituyen una gran preocupación para la salud pública (Lewis, 1967) y la industria lechera (Jones y Seymour, 1988). Esto se debe a la generación de bacterias multi-resistentes (Sawant et al., 2007) y a los procesos alérgicos que ocasiona en el consumidor (Lewis, 1967); así como por

la interrupción de los tratamientos fermentativos de la leche (Nascimento et al., 2001; Schiffmann, 1992; Cogan, 1972). Por esta razón, las empresas lácteas monitorean permanentemente la presencia de estos residuos en la leche que acopian y los resultados son considerados en sus políticas de pago (IDF, 2002); inclusive, en ciertos países, las regulaciones gubernamentales prohíben la presencia de residuos de antibióticos en la leche destinada al consumo humano (Ruegg y Tabone, 2000).

En este contexto, la industria farmacéutica veterinaria se ve en la exigencia de producir y/o comercializar formulaciones antibióticas que, sin desmedro de su eficacia, tengan un período de retiro muy breve. Así, el ceftiofur clorhidrato, una cefalosporina semisintética de tercera generación, constituye un antibiótico de elección debido al tiempo cero para suspender el fármaco (Prescott, 1993).

Considerando que este fármaco es utilizado ampliamente en la producción de bovinos lecheros, es importante verificar su ausencia en la leche post aplicación, para asegurar así un tiempo de retiro cero.

8. Fecha de Estudio y duración

El estudio tuvo una duración de 1 semana. Se desarrolló entre el 02/08/2010 al 08/08/2010.

9. Materiales y Métodos

9.1. Diseño experimental

Posterior a la selección de los animales, se procedió a tomar una muestra de leche de cada animal mediante el ordeño manual de los cuatro cuartos de cada vaca, para verificar la ausencia de algún tipo de residuo antibiótico. Estas muestras fueron clasificadas como muestra pre tratamiento (Pre-Tto).

Luego de descartar la presencia de algún tipo de residuo antibiótico, los animales fueron asignados de manera aleatoria en 2 grupos experimentales de 10 animales cada uno, el Grupo tratamiento (GT) o Grupo A y el Grupo control (GC) o Grupo B. El GT fue dosificado con la formulación comercial a base ceftiofur clorhidrato vía intramuscular profunda a una dosis de 1mg/Kg PV. El GC recibió una aplicación de suero fisiológico vía intramuscular profunda a un volumen de aplicación de 1 ml por cada 10 Kg. de peso vivo.

Una vez realizado el tratamiento se tomaron muestras de leche de todos los animales mediante ordeño manual a las 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 y 96 horas post aplicación, considerándose las 00 horas como el tiempo de aplicación del producto. Todas las muestras fueron mantenidas en cadena de frío según las recomendaciones del laboratorio hasta su posterior análisis.

9.2. Selección e identificación de animales

Se seleccionaron 20 animales. Los animales fueron seleccionados aleatoriamente de una población de 80 vacas en producción. Como criterios de inclusión se consideraron animales de segundo parto en mediana producción con un peso promedio de 500kg. Como criterios de exclusión, no se consideraron animales que hayan recibido terapia antibiótica durante los últimos 15 días previos al estudio.

Los animales se encontraron previamente identificados mediante aretes con su nombre respectivo.

9.3. Manejo de los animales experimentales

Los animales en cuestión fueron alimentados con una dieta a base de pasturas naturales y cultivadas y se les proporcionó agua ad libitum para su consumo

9.4. Producto Farmacéutico Veterinario en Investigación (PFVI), producto control

El PFVI es una suspensión antibiótica comercial a base de 50 mg de Ceftiofur Clorhidrato por cada mL. de solución.

9.5. Tratamiento

-Grupo A: Formulación comercial a base ceftiofur clorhidrato (Cefa-Ject®) vía intramuscular profunda a una dosis aproximada de 1mg/kg de peso vivo (PV).

-Grupo B: Suero fisiológico vía intramuscular profunda a un volumen de aplicación de 1 mL por cada 10 Kg. de peso vivo.

Los fármacos empleados fueron transportados, almacenados y administrados siguiendo las indicaciones de sus respectivas casas productoras

9.6. Disposición final de animales y del PFVI

Luego del estudio, los animales continuaron con su ciclo productivo normal y siguieron con su vida rutinaria.

9.7. Evaluación de Efectividad / Eficacia

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). Delvotest® SP (Bacillus stearothermophilus var. Calidolactis), es un test rápido que inhibe el crecimiento y la producción de ácido del microorganismo Bacillus stearothermophilus variedad Calidolactis. Con la adición de leche y la subsecuente incubación, el microorganismo germina y produce ácido carbónico. Es un test simple, sensible y relativamente rápido, cuando se compara con otras pruebas. Su uso está aprobado por la FDA (Administración de alimentos y fármacos, por sus siglas en inglés) y es reconocido por la AOAC (Asociación americana de químicos analistas, por sus siglas en inglés) desde 1982. Es considerado de amplio espectro, ya que detecta antibióticos betalactámicos, no betalactámicos, sulfas y tilosina, entre otros (Camacho et al. 2010).

La sensibilidad de Delvotest ® SP-NT, 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. Las drogas enlistadas son una selección de la muestra del espectro de detección. 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.

La prueba consiste en 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 antifolante trimetoprim. El medio es coloreado en púrpura por el indicador de pH púrpura de bromocresol.

Cuando se procesan muestras de leche que están libres de sustancias antibacterianas o aquellas que contienen concentraciones por debajo de niveles especificados, se produce la germinación y crecimiento de la bacteria. Esto conducirá a un cambio en color del indicador de púrpura a amarillo. Sin embargo, cuando la muestra de leche contiene sustancias antibacterianas por encima de la sensibilidad de la prueba, el crecimiento bacteriano 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 billón (ppb), respectivamente

9.8. Métodos estadísticos

Se utilizó estadística descriptiva para presentar los datos obtenidos

10. Evaluación de Efectos adversos (EA)

Durante el presente estudio no se observó la presencia de ningún efecto adverso en los animales.

11. Resultados

Ambos grupos experimentales resultaron negativos a la presencia antibiótica antes del inicio del estudio. Las concentraciones de ceftiofur en leche en ambos grupos experimentales se encontraron por debajo de los límites de detección de la prueba (25ng/ml que equivale a 0.025ug/ml) desde las 12 hasta las 96 horas (4 días) post aplicación del producto. Estos resultados son similares a los evidenciados por Owens *et al* (1990) quienes encontraron concentraciones menores a 0.01ug/ml. tras la inyección intramuscular de 500mg de ceftiofur. Así mismo, se concuerda con lo establecido de que el ceftiofur no se acumula en los tejidos tras la administración de múltiples dosis (Craigmill *et al.*, 1997). Los resultados de laboratorio se pueden apreciar en el anexo 1 (Día 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 equivalen a 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 y 96 horas post tratamiento)

12. Conclusiones

Se concluye que la leche de animales tratados parenteralmente con la suspensión antibiótica comercial en base a Ceftiofur clorhidrato (Cefa-Ject®) puede ser destinada para consumo humano sin necesidad de período de retiro

13. Autores del RF

Olga Li E., Médico Veterinario del laboratorio de Patología Clínica de la FMV-UNMSM

José Tang Ploog, Médico Veterinario Sub-Gerente de Investigación y Desarrollo de Agrovet Market S.A.

Luis Alfredo Chávez Balarezo, Médico Veterinario Asistente de Investigación y Diseño Experimental de Agrovet Market S.A.

14. Referencias Bibliográficas

- Adesiyun AA**, Webb LA, Balbirsingh V. 1997. Prevalence of antimicrobial residues in preprocessed and processed cows' milk in Trinidad. *J Food Safety* 16: 301-310.
- Caballero A**. 2008. Control sanitario de la leche y los productos lácteos. Cap.18. En: Caballero A. Eds. *Temas de Higiene de los alimentos*. La Habana: Ciencias Médicas. 382p.
- Camacho L**, Cipriano M, Cruz B, Gutiérrez I, Hernández P, Peñalosa I, Nambo O. 2010. Residuos de antibióticos en leche cruda comercializada en la región Tierra Caliente, de Guerrero, México. *REDVET* Vol.11, N°02 [Internet], [02 junio 2011]. Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n020210/021009.pdf>
- Craigmill AL**, Brown SA, Wetzlich SE, Gustafson CR, Arndt TS. 1997. Pharmacokinetics of ceftiofur and metabolites after single intravenous and intramuscular administration and multiple intramuscular administrations of ceftiofur sodium in sheep. *J. VetPharmacol. Therap.* 20, 139-144.
- Cogan MT**. 1972. Susceptibility of Cheese and Yoghurt Starter Bacteria to Antibiotics. *Applied Microbiology*. 23(5):960-965.
- [IDF]** International Dairy Federation. 2002. Payment systems for ex-farm milk. Brussels: IDF. Bull N° 379/2002. 65 p.
- Jones GM**, Seymour EH. 1988. Cowside antibiotic residue testing. *J Dairy Sci* 71: 1691-1699.
- Lewis AK**.1967. *Milk Production and Control*. 4th ed. London: H.K. Lewis.
- Llanos G**. 2002. Determinación de residuos de antibióticos en la Leche fresca que consume la población de Cajamarca. *Revista Amazónica de Investigación Alimentaria*, V.2 N° 2 p. 35 – 43.




- Nascimento** GGF, Maestro V, Campos MSP. 2001. Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite comercializado em Piracicaba, SP. *Rev Nutr* 14(2): 119-124.
- Owens** WE, Xiang ZY, Ray CH, Nickerson SC. 1990. Determination of milk and mammary tissue concentrations of ceftiofur after intramammary and intramuscular therapy. *J Dairy Sci.* Dec;73(12): 3449-56.
- Prescott** J.F. 2002. Antibióticos beta-lactámicos: cefalosporinas y cefamicinas. En: Prescott JF, Baggot JD, Walker RD. Eds. *Terapéutica Antimicrobiana en Medicina Veterinaria*. 3ra Ed. Argentina: Inter- Médica Editorial, pp: 118-141.
- Ruegg** PL, Tabone TJ. 2000. The relationship between antibiotic residue violations and somatic cell counts in Wisconsin dairy herds. *J Dairy Sci* 83: 2805-2809.
- Sawant** A, Hegde N, Straley B, Donaldson S. Antimicrobial-Resistant Enteric Bacteria from Dairy Cattle. *App Environ Microbiol.* 2007: 73: (1) 156-163.
- Sawant** AA, Sordillo LM, Jayarao BM. 2005. A survey on antibiotic usage in dairy herds in Pennsylvania. *J Dairy Sci* 88: 2991-2999




15. Anexos (formatos empleados para el registro de los datos, consentimiento informado si aplica, otros)

Anexo 1. Resultados de Laboratorio



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
LABORATORIO DE PATOLOGIA CLINICA
Av. Circunvalación – Cda. 29 San Borja
Telf. 435-3348 – Anexo 237



INFORME DE EVALUACION DE RESIDUOS DE ANTIBIOTICOS

Nro. : 600 - 10

SOLICITANTE : AGROVETMARKET S.A.

MUESTRA : MUESTRAS DE LECHE VACA (180 muestras)
PROTOCOLO N° 17 – AMAISA - 2010

ANALISIS SOLICITADOS: 1) Evaluación de residuos de antibiótico CEFTIOMAX
(Método DELVOTEST SP - NT)

FECHA DE SOLICITUD : Agosto de 2010.

RESULTADOS :

CUADRO 1: Evaluación de residuos de Ceftiomax en Vacas Lecheras

Nombre de la vaca	Producto aplicado	Dosis aplicada	Pre-Tto	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8
Preta	Ceftiomax	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jade	Ceftiomax	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Zori	Ceftiomax	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Carolina	Ceftiomax	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lucky	Ceftiomax	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Chani	Ceftiomax	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Janet	Ceftiomax	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Monica	Ceftiomax	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lucero	Ceftiomax	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Evelin	Ceftiomax	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pimera	Suero fisiológico	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dominica	Suero fisiológico	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Yoko	Suero fisiológico	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Daysi	Suero fisiológico	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Estrella	Suero fisiológico	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kari	Suero fisiológico	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sally	Suero fisiológico	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-



agrovetermarket
animalhealth

AGROVETMARKET S.A.

Animal health
Área de Investigación y Desarrollo

Sub-Gerencia de Salud Animal

Av. Canadá 3792 San Luis. Telf. 4352323 anexos 401/408 Fax. 4351833




UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
LABORATORIO DE PATOLOGIA CLINICA
Av. Circunvalación – Cda. 29 San Borja
Telf. 435-3348 – Anexo 237



Cindy	Suero fisiológico	10	-	-	-	-	-	-	-	-
Jade	Suero fisiológico	10	-	-	-	-	-	-	-	-
Lola	Suero fisiológico	10	-	-	-	-	-	-	-	-

Lima, 04 de marzo de 2011.


M.V. **ARNALDO ALVARADO SANCHEZ**
Área de Microbiología Clínica y Pruebas Especiales
Lab. Patología Clínica- FMV – UNMSM

