

## REPORTE FINAL DE ESTUDIO

### 1. Título

Detección de Residuos de una infusión antibiótica comercial en base a Cefalexina monohidrato y Gentamicina sulfato (Cefa-Milk<sup>®</sup> Forte) en leche vacuna.

### 2. Número de Ensayo

NN- 10-1

### 3. Tipo de Estudio

Ensayo de laboratorio

### 4. Objetivo General

Determinar el tiempo de residualidad de una infusión antibiótica comercial en base a Cefalexina monohidrato y Gentamicina sulfato en leche vacuna.

### 5. Investigador

**Olga Li Elias**, Magister Química Farmacéutica del Laboratorio de Patología Clínica de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

### 6. Monitor

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

### 7. Sponsor

**Agrovvet Market S.A.**

### 8. 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 del distrito de Pachacamac de la ciudad de Lima, ubicada en la costa central del Perú, sobre los 75 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.

### 9. Antecedentes

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 investigar e informar sobre los períodos de retiro de las formulaciones antibióticas que desarrolla. Así, el presente trabajo se realizó con el objetivo de evaluar la presencia de residuos de cefalexina y gentamicina en la leche tras el uso de Cefa-Milk<sup>®</sup> Forte como agente terapéutico a la dosis recomendada.

## 10. Fecha de Estudio y duración

El estudio tuvo una duración de 1 semana. Se desarrolló entre el 07/01/2010 al 13/01/2010.

## 11. Materiales y Métodos

### 11.1. Tratamiento

Formulación comercial en base a cefalexina monohidrato (200 mg), gentamicina sulfato (100 mg), dexametasona 21 fosfato (0.75 mg) y vitamina A (10 000 UI) en 10ml (Cefa-Milk<sup>®</sup> forte). El tratamiento constó de la aplicación intramamaria de 10ml del producto en un cuarto de cada animal.

### 11.2. Tamaño de muestra

Se trabajó con 20 animales, considerando 10 animales por cada grupo experimental.

### 11.3. Selección de animales e identificación

Los animales fueron seleccionados de una población de 40 vacas en producción. Como criterios de inclusión se consideraron animales de segundo parto en mediana producción con un peso promedio de 480kg. Como criterios de exclusión, no se consideraron animales que hayan recibido terapia antibiótica durante los últimos 10 días previos al estudio.

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

### 11.4. Diseño experimental

El presente estudio se realizó con un diseño aleatorio simple. Posterior a la selección de los animales, estos fueron asignados de manera aleatoria en 2

grupos experimentales de 10 animales cada uno, el Grupo tratamiento (GT) y el Grupo control (GC). Previo a la aplicación del tratamiento, se procedió a tomar dos muestras de leche (1 muestra de un cuarto anterior y 1 muestra de un cuarto posterior) de cada animal del GT, y una muestra de leche de los animales del GC, mediante el ordeño manual, para verificar la ausencia de algún tipo de residuo antibiótico. Estas muestras fueron clasificadas como muestra pre tratamiento (Pre-Tto).

El GT recibió una aplicación intramamaria de 10ml de la formulación comercial a base de cefalexina monohidrato (200 mg), gentamicina sulfato (100 mg), dexametasona 21 fosfato (0.75 mg) y vitamina A (10 000 UI) (Cefa-Milk® forte) en el cuarto anterior previamente muestreado. El GC no recibió tratamiento alguno.

Una vez realizado el tratamiento se tomaron 2 muestras de leche (cuarto anterior tratado y cuarto posterior no tratado) de cada uno de los animales del GT y una muestra de leche de los animales del GC, mediante ordeño manual a las 12, 24, 36, 48, 60, 72 y 84 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.

#### 11.5. Prueba de laboratorio

Las muestras fueron trabajadas en el laboratorio con el Kit Delvotest SP – NT de acuerdo con la metodología descrita por el fabricante. 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. Esto conduce a un cambio en el 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 el FDA, USDA (Camacho *et al.*, 2010) y el Codex alimentarius.

El nivel de detección de Delvotest SP-NT para cefalexina se ha establecido en 68ug/kg (Althaus *et al.*, 2002). El nivel de detección se refiere a la concentración más baja en la cual una droga es todavía detectada por la prueba, al tiempo de lectura fijo de 3 horas. Por su parte, el nivel de detección de Delvotest SP-NT para gentamicina es de 200 ppb o ng/ml.

La cefalexina no tiene establecido un límite máximo de residuo (LMR) por el Codex alimentarius. Sin embargo, la Unión Europea establece un LMR de 100ug/kg para este antibiótico (Reglamento (UE) No 37/2010 de la

Comisión Europea). Por su parte la gentamicina tiene una LMR establecido por el Codex alimentarius de 200ng/ml.

11.6. Manejo de los animales experimentales

Los animales fueron alimentados en base a forraje y alimento concentrado, recibiendo dos raciones al día. Se les brindó agua *ad libitum*.

11.7. Parámetros evaluados

Se evaluó la presencia de cefalexina y gentamicina en la leche de los animales según el límite de detección de la prueba, que es menor al LRM establecido por la Unión Europea en el caso de la cefalexina o equivalente al LMR establecido por el Codex alimentarius en el caso de la gentamicina. Las muestras que viraron al color amarillo fueron consideradas muestras negativas (-) y las muestras que permanecieron de color púrpura fueron consideradas muestras positivas (+).

11.8. Métodos estadísticos

Se utilizó estadística descriptiva para presentar los datos obtenidos.

## 12. Resultados

Ambos grupos experimentales resultaron negativos a la presencia antibiótica antes del inicio del estudio, a excepción de un animal del grupo control (Lauria) el cual había recibido tratamiento antibiótico parenteral no registrado. Los resultados obtenidos se pueden apreciar en resumen en la tabla 1. Al realizar el análisis se consideró al animal como unidad experimental, teniendo en cuenta que si un animal obtuvo una muestra de leche positiva y otra negativa (diferentes cuartos) fue considerado como animal positivo.

En general, se evidenció la presencia de residuos antibióticos en el 100% (10/10) de los animales del GT desde las 12h post tratamiento. Cabe recalcar que el 100% (10/10) de las muestras de los cuartos anteriores donde se aplicó el tratamiento de los animales del GT presentaron residuos antibióticos desde las 12h post tratamiento, mientras que un 20% (2/10) de las muestras de los cuartos posteriores de los animales del GT permanecieron negativas hasta las 24h post tratamiento. Esto demostraría que los antibióticos se difunden a la leche de los cuartos no tratados.

El 100% (10/10) y 80% (8/10) de los animales del GT permanecieron positivos hasta las 48h y 60h post tratamiento, respectivamente. Cabe mencionar que en el quinto ordeño (60h post tratamiento) se observó que el 80% (8/10) de las muestras obtenidas de los cuartos posteriores fueron negativas a residuos antibióticos (tabla 2), lo cual nos podría indicar que los residuos antibióticos en la leche de los cuartos no tratados desaparecen más rápidamente en comparación con los cuartos tratados (Gráfico 1).

Las concentraciones de cefalexina y gentamicina en leche de los animales del grupo tratado con Cefa-Milk® Forte se encontraron por debajo de los límites de detección de la prueba (68ug/kg y 200ng/ml respectivamente) desde las 72 hasta las 84 horas (7º ordeño) post aplicación del producto.



**Tabla 1. Resultados de residuos antibióticos mediante la prueba de Delvotest® SP-NT en leche de animales tratados con Cefa-Milk® Forte, desde las 00horas hasta las 84 horas post-tratamiento, Establo Casablanca, Lima, enero 2010.**

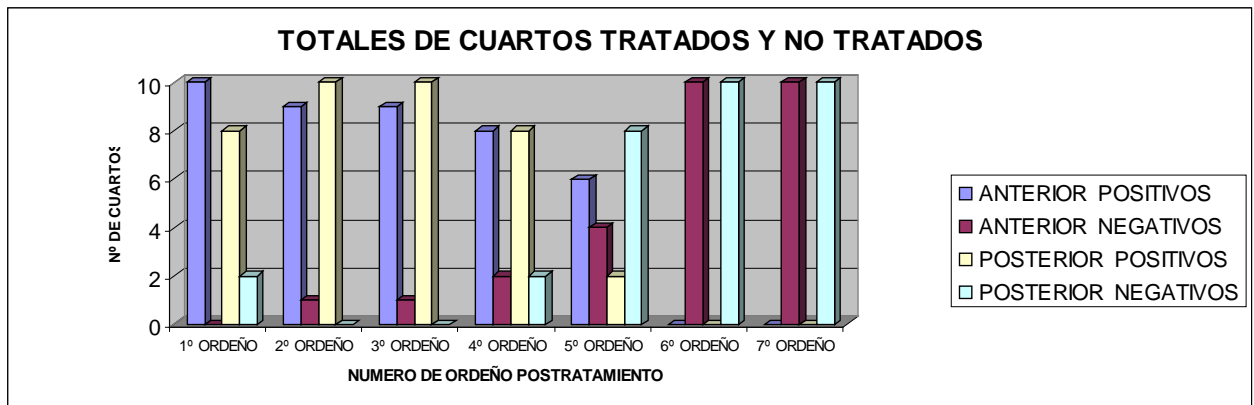
Grupo	Arete	Cuarto mamario	Horas post tratamiento (# ordeño post tratamiento)							
			00h (Pre-tto)	12h (1º)	24h (2º)	36h (3º)	48h (4º)	60h (5º)	72h (6º)	84h (7º)
GT	Olga	CA*	-	+	-	-	-	-	-	-
	Olga	CP*	-	-	+	+	+	+	-	-
	Greta	CA	-	+	+	+	+	+	-	-
	Greta	CP	-	+	+	+	+	-	-	-
	Meche	CA	-	+	+	+	+	+	-	-
	Meche	CP	-	+	+	+	+	-	-	-
	Sofia	CA	-	+	+	+	+	-	-	-
	Sofia	CP	-	+	+	+	-	-	-	-
	Charo	CA	-	+	+	+	+	+	-	-
	Charo	CP	-	+	+	+	+	-	-	-
	001	CA	-	+	+	+	-	-	-	-
	001	CP	-	-	+	+	+	+	-	-
	002	CA	-	+	+	+	+	+	-	-
	002	CP	-	+	+	+	+	-	-	-
	003	CA	-	+	+	+	+	+	-	-
	003	CP	-	+	+	+	+	-	-	-
004	CA	-	+	+	+	+	-	-	-	
004	CP	-	+	+	+	-	-	-	-	
005	CA	-	+	+	+	+	+	-	-	
005	CP	-	+	+	+	+	-	-	-	
GC	Sol	-----	-	-	+	-	-	-	-	-
	Luna	-----	-	-	-	-	-	-	-	-
	Bella	-----	-	-	-	-	-	-	-	-
	Lauria	-----	+	+	+	-	-	-	-	-
	Merelyn	-----	-	-	-	+	-	-	-	-
	006	-----	-	-	+	-	-	-	-	-
	007	-----	-	-	-	-	-	-	-	-
	008	-----	-	-	-	-	-	-	-	-
	009	-----	-	-	-	-	-	-	-	-
	010	-----	-	-	-	+	-	-	-	-

\* CA: cuarto anterior; CP: cuarto posterior

**Tabla 2. Frecuencia de muestras positivas y negativas a residuos antibióticos de cefalexina y gentamicina por cuarto mamario en animales tratados con Cefa-Milk® Forte, Establo Casablanca, Lima, enero 2010.**

Cuarto mamario	Residuos antibióticos	00h Pre-Tto	Horas post tratamiento (# ordeño post tratamiento)						
			12h (1º)	24h (2º)	36h (3º)	48h (4º)	60h (5º)	72h (6º)	84h (7º)
Anterior (tratado)	POSITIVOS	0	10	9	9	8	6	0	0
	NEGATIVOS	10	0	1	1	2	4	10	10
Posterior (no tratado)	POSITIVOS	0	8	10	10	8	2	0	0
	NEGATIVOS	10	2	0	0	2	8	10	10

**Gráfico 1. Persistencia de residuos antibióticos de Cefa-Milk Forte® según cuarto mamario, Establo Casablanca, Lima, enero 2010.**



Cinco animales del grupo control presentaron muestras positivas a residuos antibióticos. Uno de ellos fue Lauria, la cual había recibido tratamiento antibiótico parenteral y tuvo resultados positivos durante las 24 primeras horas del estudio. Los resultados positivos de los animales Sol y 006 a las 24h post tratamiento, así como de Merelyn y 010 a las 36h post tratamiento, podrían considerarse como una falla en la lectura o interpretación de la prueba dado que no hay continuidad en el tiempo para dichos resultados.

### 13. Conclusiones

Se concluye que el tiempo que debe transcurrir entre el último tratamiento con Cefa-Milk® Forte y el destino de la leche para consumo humano debe ser mayor a 60 horas (quinto ordeño).

### 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.
- Althaus** RL, Peris C, Montero A, Torres A, Molina P. 2002. Detection limits of antimicrobial agents in ewe milk by Delvotest. *Milchwissenschaft* 57:660-664.
- 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, Peñaloza 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>
- 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 residuos de antibioticos no leite comercializado em Piracicaba, SP. Rev Nutr 14(2): 119-124.
- 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.
- Schiffmann** AP. 1992. Methodological and legal problems relating to the detection of inhibitory substances in milk. Thesis Thierarztliche Hochschule. Hannover, Germany.

## 15. Firmas y Sellos del equipo de trabajo

**Investigador: Olga Li Elias**

Fecha: 24/04/2012

Firma y sello

