

NOTA TÉCNICA

EVALUACIÓN DE LOS PERÍODOS DE RESGUARDO DE DIFERENTES ANTIBIÓTICOS DE APLICACIÓN INTRAMAMARIA EN VACAS CON MASTITIS CLÍNICA

Betty San Martín, M.V.D.M.V.; Valeria Rojas, M.V.; Claudia Martínez, M.V.; Juan Puga, M.V.

EVALUATION OF WITHDRAWAL TIMES OF DIFFERENT ANTIBIOTICS USED INTRAMAMARY IN COWS WITH CLINIC MASTITIS

The present study evaluated the withdrawal time in milk of eight different pharmaceutical formulas. Four of them contained only one antibiotic in its formulation (monodrugs). The remaining contained more than one drug (association). For each formulae, ten animals with clinic mastitis from different farms of Region Metropolitana were used. All formulas were administered according to the laboratories instructions.

The Microbiological Analytical Cylinder Plate Method was used for laboratory analysis, using Bacillus subtilis BGA as the indicator organism. This method showed a sensibility of 0,08 µg/ml for cefoperazone and cefacetrile, and 0,04 µg/ml for pirlimycin.

Time related concentrations were calculated in the monodrugs elaborating reference curves and the lineal regression equation was used to convert the inhibition halos, expressed in centimetres, in concentrations units µg/ml.

Only qualitative results were obtained in the associations because the method does not detect antibiotics individually; these results were expressed as presence or absence of antibiotics, according to the sensitivity levels of the method.

The withdrawal times for cefoperazone were of 84 and 108 hours for group A and B respectively. For cefacetril and pirlimycin the withdrawal times were of 96 and 36 hours, respectively.

The withdrawal times for the association pharmaceutical formulas of lincomycin / neomicin / penicillin G sodic / dihidroestreptomycin / nafcillin and penicillin G procain / novobiocin / polimixin B / dihidroestreptomycin were of 72 hours. The espirimicin / neomicin association was of 96 hours.

Key words: Withdrawal times, antibiotics, mastitis, cows.

Palabras claves: Períodos de resguardo, antibióticos, mastitis, vacas lactantes.

INTRODUCCIÓN

El uso de antibióticos y sulfas en Medicina Veterinaria sin lugar a dudas ha sido una de las principales herramientas en el control, y en algunos casos en la erradicación de enfermedades infecciosas de origen bacteriano en animales de abasto y compañía. Sin

embargo, casi paralelamente con su introducción, se comenzó a investigar en torno a los efectos que pudiera provocar en la población humana la presencia de estos fármacos en productos de origen animal como son leche, carne y huevos (Berridge, 1956).

Actualmente este tema ha tomado aún mayor relevancia, restringiéndose o prohibiéndose en determinados casos el uso de algunas de estas drogas en la terapéutica veterinaria. Así por ejemplo, Estados Unidos, Canadá, Comunidad Europea (Settepani, 1984; Food and Drugs Administration, FDA, 1991) y otros países prohíben el empleo del cloramfenicol en ani-

Laboratorio de Farmacología, Departamento de Ciencias Clínicas, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias; Universidad de Chile.

Trabajo financiado por: Proyecto DTI A-3518, Universidad de Chile.

males de abasto, ya que de todos los fármacos que pueden producir pancitopenia en la población humana, éste es el principal responsable. De hecho en estos países existen penalidades si se encuentran trazas de esta droga en productos finales como son carne, leche y huevo.

En Chile la situación no deja de ser diferente, razón por la cual el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) del Ministerio de Agricultura prohibió el uso de fármacos que contengan cloramfenicol o cualquiera de sus sales, en animales cuyos productos o subproductos, con o sin industrialización, sean destinados a la población humana (Diario Oficial de Chile, 1996).

La forma más sencilla de disminuir este factor de riesgo es respetar los *períodos de resguardo* denominados también *períodos de carencia o tiempos de espera* que debe tener la leche proveniente de animales tratados con estos fármacos. Éstos deben ser definidos por las industrias farmacéuticas en relación a los Límites Máximos Permitidos (LMR) sugeridos por la Food and Drug Administration (FDA, 1991) Unión Europea (UE) (Diario Oficial de las Comunidades Europeas, Reglamento CE N° 2377/90) y la FAO/WHO (1995).

Los LMR se establecieron con el objetivo de asegurar y proteger la salud del consumidor y son definidos por la Unión Europea como "el contenido máximo de residuos resultantes de la utilización de un medicamento veterinario (expresado en mg/kg o en µg/kg sobre la base del peso en fresco), autorizada en la Comunidad o reconocida como admisible en un producto alimentario" (Diario Oficial de las Comunidades Europeas, Reglamento CE N° 2377/90). Al respecto, en abril de 1996 en París, en una reunión realizada por el VICH (Armonización Internacional de la Coordinación Veterinaria) se abordó el tema del uso de medicamentos entre Estados Unidos de América, Unión Europea y Japón. Dentro de los puntos importantes señalan la necesidad de establecer una uniformidad en los LMR, asegurando una mayor confianza al consumidor y eliminando barreras comerciales relacionadas con este aspecto (Jones, 1997).

Contrariamente a lo que sucede con los LMR, los cuales son específicos para cada droga, el *período de resguardo* no constituye una constante de un principio activo determinado, sino un elemento específico de cada fórmula farmacéutica, que varía según diversos parámetros tales como la naturaleza del excipiente y la vía de administración (Mc Ewen y col., 1991; Riviere, 1991; Morétain, 1997).

Esto ha motivado que en países como Francia, el Laboratorio Nacional de Medicamentos Veterinarios junto con la Federación Nacional de Productores de Leche, periódicamente estén realizando estudios con

el fin de mantener actualizados los *períodos de resguardo* de acuerdo a los antibióticos y fórmulas farmacéuticas existentes en el mercado (Morétain y col., 1983; Morétain y Boisseau, 1993).

Lo mismo ocurre en otros países, como por ejemplo Canadá, en el cual el Ministerio de Agricultura cada cierto tiempo financia investigaciones para ir controlando este aspecto (Mc Ewen y col., 1991). También es importante destacar la iniciativa de la Federación Nacional de Productores de Leche en Estados Unidos que en conjunto con la Asociación Médica Veterinaria Americana, desarrollaron un programa con el objeto de promover el uso responsable y controlado de los antibióticos en la industria lechera (Boeckman y Carlsson, 1996).

En Chile, recién a partir de septiembre del año 1995, el SAG en el *Reglamento de Productos Farmacéuticos de Uso Exclusivamente Veterinario*, hace obligatorio que en el Registro de Productos las industrias farmacéuticas indiquen en el etiquetado las dosis, vías de administración y especies de destino, agregando además el *período de resguardo* que deben tener estos fármacos en leche y carne destinadas a consumo humano, poniendo énfasis en que éstos deben ir avalados por sus estudios correspondientes. En este Reglamento se indica, además, que los productos registrados en el Instituto de Salud Pública, antes de esta fecha, tendrán un plazo de cinco años para actualizar sus registros.

Diversos métodos han sido empleados para detectar residuos de antibióticos en leche. Dentro de ellos podemos mencionar los inmunológicos, inmunoquímicos, fisicoquímicos y microbiológicos fundamentalmente (Aerts y col., 1995).

Los métodos microbiológicos se basan en la capacidad de difusión del antibiótico en un medio de cultivo que contiene una determinada cepa bacteriana. Éstos tienen la ventaja de detectar un gran número de antibióticos, ser altamente sensibles, de fácil implementación y bajos costos. Se pueden utilizar para definir tiempos de espera frente a una droga conocida (Morétain, 1997) y como control primario más general, cualitativo, rápido y económico, cuyo único requisito sea garantizar una precisión como mínimo igual a los LMR (Gilbertson y col., 1995; Hernández y col., 1997).

En el presente trabajo se plantea evaluar mediante el Método Microbiológico de Cilindros en Placa los *períodos de resguardo* de diferentes fórmulas farmacéuticas de antibióticos existentes en el mercado nacional, utilizados en la terapia de mastitis clínica vía intramamaria, ya que la información al respecto es escasa o nula en algunas de ellas, dado que sus registros figuran con anterioridad al año 1995.

MATERIAL Y MÉTODOS

— Animales de experimentación

Se utilizaron 80 vacas en lactancia pertenecientes a predios lecheros de la Región Metropolitana, Chile. Todas ellas cursaban con mastitis clínica aguda en uno o más cuartos mamarios y no habían recibido tratamiento con algún antibiótico a lo menos 30 días antes de iniciar el estudio.

El diagnóstico de la mastitis clínica se realizó por visualización de anomalías de la leche tales como: presencia de coágulos, suero y sangre, conjuntamente con la evaluación de la glándula mamaria y el estado general del animal. Sumado a esto y considerando que no se realizó aislamiento bacteriano, para la selección del antibiótico se tomaron en cuenta, además, los antecedentes etiológicos previos del plantel lechero. A todos los animales, previo a la administración del fármaco, se les realizó un análisis para confirmar la ausencia de algún antibiótico. Se eliminaron del estudio aquellos animales que no respondieron a la terapia inicial (6 animales).

— Fármacos empleados

Se utilizaron 8 fórmulas farmacéuticas de aplicación intramamaria; 4 con un antibiótico y 4 con asociaciones de antibióticos. Para cada producto se utilizaron grupos de 10 animales y éstos se describen a continuación:

- Grupo A: Cefoperazona sódica 250 mg (fórmula farmacéutica A).
- Grupo B: Cefoperazona 250 mg (fórmula farmacéutica B).
- Grupo C: Cefacetil sal sódica 235 mg.
- Grupo D: Pirlimicina HCL equivalente a 50 mg de pirlimicina.
- Grupo E: Espiramicina 6.000.000 U.I.
Neomicina 2,0 g.
- Grupo F: Lincomicina base 200 mg.
Neomicina base 200 mg.
- Grupo G: Penicilina G sódica 300.000 U.I.
Dihidroestreptomocina (sulfato) 100 mg.
Nafcillin 100 mg.
- Grupo H: Penicilina G procaína 100.000 U.I.
Novobiocina sódica 150 mg.
Polimixina B 50.000 U.I.
Dihidroestreptomocina 100 mg.

— Administración de los fármacos y obtención de muestras

Una vez lavado y desinfectado el pezón del cuarto afectado, previa ordeña a fondo, los productos se

administraron vía intramamaria. Las dosis y ritmo horario (repetición del tratamiento) se realizaron de acuerdo a las instrucciones recomendadas por las industrias farmacéuticas, con el objetivo de verificar si la información entregada de los *períodos de resguardo* concuerda con los resultados obtenidos en el presente trabajo. Además se entregan resultados sobre este parámetro de fórmulas farmacéuticas, de las cuales actualmente la información a nivel nacional es escasa.

Las muestras de leche comenzaron a recolectarse a la ordeña siguiente, después de la administración del último pomo intramamario. El número de muestras a tomar dependió del producto administrado y de la frecuencia de ordeñas en cada predio; para pirlimicina después de las 24 horas se tomaron muestras cada 4 h. Para aquellas fórmulas farmacéuticas en que existía información el muestreo finalizó un día después del período de resguardo señalado por los laboratorios; en aquellas en que la información es escasa o nula finalizó cuando las muestras se hicieron negativas.

En la Tabla 1 se describen las dosis, frecuencia de ordeña, días de muestreo y número de muestras para cada grupo de animales.

Las muestras fueron obtenidas de acuerdo a las normas del National Mastitis Council (1990) recibiendo en frascos estériles iguales volúmenes de leche. Éstas se transportaron en forma refrigerada al laboratorio donde se mantuvieron a 4°C hasta el momento de su análisis. Todas las muestras fueron analizadas antes de 48 horas.

— Detección de antibióticos en leche

Las muestras fueron analizadas mediante la Técnica Microbiológica de Cilindros en Placa, estandarizada por la Association of Official Analytical Chemist (A.O.A.C. 1984), realizando algunas modificaciones fundamentalmente relacionadas con el pH del medio de cultivo (Gesche, 1986; San Martín y Moraga, 1996). Cada muestra fue analizada con medios de cultivo a pH 6 y 7, seleccionándose en cada caso aquel que mostró una mejor sensibilidad.

Como cepa bacteriana se utilizó *Bacillus subtilis* BGA esporuladas y mantenidas según las recomendaciones dadas por el A.O.A.C. (capítulo 42.206, 1984), ya que presenta una adecuada sensibilidad para los antibióticos en estudio (Gesche, 1986; San Martín y Moraga, 1996). Los medios de cultivo se mezclaron con una concentración de 3×10^3 esporas/ml de agar, concentración previamente definida según San Martín y Moraga, 1996, como óptima; esta concentración fue chequeada por recuento bacteriano.

Previo al análisis, las muestras fueron tratadas a 100°C por 30 segundos, con el fin de eliminar los inhibidores naturales de la leche (Rama y col., 1985; Cullor y col., 1992).

Una vez preparadas las placas, sobre ellas se colocaron cilindros metálicos equidistantes entre sí; en cada uno de ellos se colocaron 200 µl de muestras de leche.

Las muestras fueron incubadas a 36°C por 18 horas. La lectura de los halos de inhibición se realizó mediante un Vernier de precisión (calipers) (A.O.A.C., capítulo 16.138, 1984) expresando los resultados como diámetro completo del halo de inhibición en cm. En aquellas fórmulas farmacéuticas en que existía un solo antibiótico, los halos de inhibición expresados en cm se transformaron a concentración (µg/ml) mediante conversión a través de una curva de referencia previamente realizada para cada droga.

—Elaboración de las Curvas de Referencia

Se realizó con leche mediante la técnica microbiológica descrita.

Se prepararon concentraciones decrecientes de cada antibiótico (cefoperazona, cefacetril, y pirlimicina) a partir de una solución madre de droga pura con una concentración de 4.000 µg/ml. La solución madre se calculó a partir de la fórmula descrita por Anhalt y Washington II (Lennett, 1985):

$$\text{peso (mg)} = \frac{\text{volumen (ml)} \times \text{concentración (µg/ml)}}{\text{potencia (µg/mg)}}$$

Para la realización de esta curva se utilizaron 7 concentraciones de cada antibiótico. Cada una de ellas se repitió 10 veces; se calculó su media (\bar{X}) y desviación estándar (D.S.).

—Análisis de los resultados

a. Curva de Referencia: Para cefoperazona, cefacetril y pirlimicina se realizó un análisis de regresión lineal a partir del promedio de las concentraciones expresadas en una escala semilogarítmica en función del tiempo (Scheffler, 1981). A partir de ella y según la siguiente ecuación, se transformaron los halos obtenidos de las muestras de leche a concentración (µg/ml):

$$[] = 10 \exp ((\text{halo}-a) / b)$$

donde [] = concentración de droga expresada en µg/ml.

b. Definición de los *períodos de resguardo*:

Para aquellas fórmulas farmacéuticas con un solo antibiótico, las muestras de leche se dieron negativas cuando sus concentraciones fueron inferiores a la sensibilidad del método; para pirlimicina se dieron negativas cuando sus concentraciones fueron iguales a su LMR. En las que existían dos o más antibióticos sólo se dio un resultado cualitativo, dándose como negativas cuando las muestras presentaron un halo de inhibición con un diámetro total igual o menor a 1,2 cm (San Martín y Moraga, 1996).

Los períodos de resguardo para cada grupo se definieron a la hora en que las muestras de leche se hicieron negativas.

En vacas tratadas en 2 o más cuartos se siguió el mismo criterio, considerándose cada cuarto como unidad independiente, ya que los *períodos de resguardo* sugeridos por la literatura son iguales, independiente de si se realiza la terapia en uno o dos cuartos de un mismo animal.

RESULTADOS

— Fórmulas farmacéuticas con un solo antibiótico

La sensibilidad de la técnica empleada para cefoperazona y cefacetril fue de 0,08 µg/ml con un halo de inhibición de 1,39 ± 0,11 cm y 1,33 ± 0,07 cm respectivamente. Para pirlimicina ésta fue de 0,04 µg/ml equivalente a un halo de inhibición de 1,3 ± 0,2 cm.

De acuerdo al análisis de regresión lineal de las drogas puras, las ecuaciones resultantes para transformar los halos a concentración son las siguientes:

Cefoperazona (r = 0,99): [] = 10 exp ((halo-2,67815)/1,165767)

Cefacetril (r = 0,99): [] = 10 exp ((halo-2,763285)/1,246848)

Pirlimicina (r = 0,95): [] = 10 exp ((halo-2,017128)/0,629469)

donde: [] = concentración de droga expresada en µg/ml.

halo = halo observado en las muestras de leche en un momento dado.

En los cuadros 2, 3, 4 y 5 se señalan los halos y sus respectivas concentraciones en función del tiempo en las muestras de leche extraídas de los grupos A, B, C y D.

CUADRO 1
PERÍODO DE RESGUARDO EN LECHE DE LAS DIFERENTES
FÓRMULAS FARMACÉUTICAS
DE APLICACIÓN INTRAMAMARIA EN VACAS CON MASTITIS CLÍNICA

TABLE 1
WITHDRAWAL TIME IN MILK OF THE DIFFERENT PHARMACEUTICAL FORMULAS USED
INTRAMAMMARY IN COWS WITH CLINIC MASTITIS

	Horas													N° Animales	
	24	28	32	36	40	48	56	60	64	72	84	96	108		
Grupo A				2		1		1		3	3				10
Grupo B				2		2		2			1		5		10
Grupo C								3		4		3			10
Grupo D	3	3	2	2											10
Grupo E											2	8			10
Grupo F					3	2	1		1	3					10
Grupo G										10					10
Grupo H								2		8					10

■ = Duración del período de resguardo para cada grupo.

CUADRO 2
CONCENTRACIÓN EN FUNCIÓN DEL TIEMPO DE CEFOPERAZONA EN LECHE,
(FÓRMULA FARMACÉUTICA "A"), DESPUÉS DE HABER ADMINISTRADO EL
ÚLTIMO POMO INTRAMAMARIO (Grupo A)

TABLE 2
TIME RELATED CONCENTRATION OF CEFAPERAZONE IN MILK,
(PHARMACEUTICAL FORMULA "A"), AFTER THE ADMINISTRATION OF THE LAST INTRAMAMMARY POMMEL (Group A)

*n		Horas									
		12	24	36	48	60	72	84	96	108	120
1	♣ Halo	3,10	3,10	2,50	1,60	—	—	—	—	—	—
	♦ []	2,30	2,30	0,70	0,12						
2	♣ Halo	2,90	2,90	2,50	2,40	2,20	1,50	—	—	—	—
	♦ []	1,55	1,55	0,70	0,58	0,39	0,10				
3	♣ Halo	2,90	2,90	2,50	2,30	1,80	—	—	—	—	—
	♦ []	1,55	1,55	0,70	0,47	0,18					
4	Halo	3,20	3,20	1,70	—	—	—	—	—	—	—
	♦ []	2,80	2,80	0,14							
5	♣ Halo	3,00	1,70	—	—	—	—	—	—	—	—
	♦ []	1,89	0,14								
6	♣ Halo	2,90	2,90	2,50	2,20	2,20	1,30	—	—	—	—
	♦ []	1,55	1,55	0,70	0,39	0,39	0,08				
7	♣ Halo	3,50	3,50	2,90	2,70	1,50	—	—	—	—	—
	♦ []	5,07	5,07	1,55	1,04	0,10					
8	♣ Halo	2,90	2,90	2,60	2,40	1,70	1,50	—	—	—	—
	♦ []	1,55	1,55	0,86	0,58	0,14	0,10				
9	♣ Halo	3,20	1,80	—	—	—	—	—	—	—	—
	♦ []	2,80	0,18								
10	♣ Halo	3,30	3,30	2,90	2,50	1,70	—	—	—	—	—
	♦ []	3,42	3,42	1,55	0,70	0,14					

*n = n° de animales tratados

♣ = halo en cm

♦ = concentración en µg/ml

CUADRO 3
CONCENTRACIÓN EN FUNCIÓN DEL TIEMPO DE CEFOPERAZONA EN LECHE,
(FÓRMULA FARMACÉUTICA "B"), DESPUÉS DE HABER ADMINISTRADO EL
ÚLTIMO POMO INTRAMAMARIO (Grupo B)

TABLE 3
TIME RELATED CONCENTRATION OF CEFAPERAZONE IN MILK,
(PHARMACEUTICAL FORMULA "B"), AFTER THE ADMINISTRATION OF THE LAST
INTRAMAMMARY POMMEL (Group B)

*n		Horas									
		12	24	36	48	60	72	84	96	108	120
1	♣ Halo	2,80	2,80	1,30	—	—	—	—	—	—	—
	♦ []	1,27	1,27	0,08	—	—	—	—	—	—	—
2	♣ Halo	3,00	3,00	2,50	2,20	2,00	1,50	—	—	—	—
	♦ []	1,89	1,89	0,70	0,39	0,26	0,10	—	—	—	—
3	♣ Halo	3,00	3,00	2,50	2,30	2,20	2,30	2,20	1,50	—	—
	♦ []	1,89	1,89	0,70	0,47	0,39	0,47	0,39	0,10	—	—
4	♣ Halo	2,90	2,90	1,30	—	—	—	—	—	—	—
	♦ []	1,55	1,55	0,08	—	—	—	—	—	—	—
5	♣ Halo	2,80	2,80	2,20	2,30	2,20	2,30	2,20	1,60	—	—
	♦ []	1,27	1,27	0,39	0,47	0,39	0,47	0,39	0,12	—	—
6	♣ Halo	3,30	3,30	2,70	2,60	2,30	2,10	2,10	1,40	—	—
	♦ []	3,42	3,42	1,04	0,86	0,47	0,32	0,32	0,08	—	—
7	♣ Halo	3,10	3,10	2,30	2,10	2,00	1,90	2,00	1,50	—	—
	♦ []	2,30	2,30	0,47	0,32	0,26	0,22	0,26	0,10	—	—
8	♣ Halo	3,10	3,10	2,20	2,10	2,10	2,00	1,90	1,50	—	—
	♦ []	2,30	2,30	0,39	0,32	0,32	0,26	0,22	0,10	—	—
9	♣ Halo	3,30	1,50	—	—	—	—	—	—	—	—
	♦ []	3,42	0,10	—	—	—	—	—	—	—	—
10	♣ Halo	3,30	2,10	—	—	—	—	—	—	—	—
	♦ []	3,42	0,32	—	—	—	—	—	—	—	—

*n = n° de animales tratados
♣ = halo en cm
♦ = concentración en µg/ml

Los *periodos de resguardo* definidos para estas fórmulas farmacéuticas fueron los siguientes:

- Cefoperazona (grupo A): 84 horas.
- Cefoperazona (grupo B): 108 horas.
- Cefacetril (grupo C): 96 horas.
- Pirlimicina (grupo D): 36 horas.

— **Fórmulas farmacéuticas con asociaciones de antibióticos**

De acuerdo a los resultados presentados en el Cuadro 1, en los grupos F, G y H el *periodo de resguardo* en leche se debe definir a las 72 horas. En el grupo E este período tiene una duración de 96 horas.

En todos los grupos hubo muestras de leche que se hicieron negativas horas o días antes de la definición de los *periodos de resguardo*.

DISCUSIÓN

Dada la escasa información a nivel nacional sobre los *periodos de resguardo* que debe tener la leche de vacas tratadas con antibióticos antes de ser enviada a consumo de la población, en el presente trabajo se evaluó este parámetro de ocho (8) fórmulas farmacéuticas de antibióticos de aplicación intramamaria, utilizadas en la terapia de las mastitis clínicas. La selección de esta vía de administración se basó en experiencias de trabajos realizados en otros países, que señalan que ésta es la responsable de la mayor ocurrencia de residuos en leche destinada al consumo humano (Scott y col., 1992; Mc Ewen y col., 1992).

Al analizar los resultados de la sensibilidad de la técnica para cefoperazona, cefacetril y pirlimicina, podemos verificar que la Técnica Microbiológica de Cilindros en Placa utilizando *Bacillus subtilis* BGA, es adecuada para definir los *periodos de resguardo* de

CUADRO 4
CONCENTRACIÓN EN FUNCIÓN DEL TIEMPO DE CEFACETRIL EN LECHE,
DESPUÉS DE HABER ADMINISTRADO EL ÚLTIMO POMO INTRAMAMARIO (GRUPO C)

TABLE 4
TIME RELATED CONCENTRATION OF CEFACETRIL IN MILK, AFTER THE
ADMINISTRATION OF THE LAST INTRAMAMMARY POMMEL (GROUP C)

*n		Horas									
		12	24	36	48	60	72	84	96	108	120
1	♣ Halo	350	3,50	3,20	1,80	—	—	—	—	—	—
	♦ []	3,90	3,90	2,24	0,17	—	—	—	—	—	—
2	♣ Halo	3,50	3,50	3,50	1,80	—	—	—	—	—	—
	♦ []	3,90	3,90	3,90	0,17	—	—	—	—	—	—
3	♣ Halo	3,50	3,50	2,40	2,40	1,80	—	—	—	—	—
	♦ []	3,90	3,90	0,51	0,51	0,17	—	—	—	—	—
4	♣ Halo	2,40	2,40	2,30	2,60	2,50	1,30	1,30	—	—	—
	♦ []	0,51	0,51	0,43	0,74	0,61	0,08	0,08	—	—	—
5	♣ Halo	3,50	3,50	2,40	2,80	1,80	—	—	—	—	—
	♦ []	3,90	3,90	0,51	1,07	0,17	—	—	—	—	—
6	♣ Halo	3,50	3,50	2,80	1,80	—	—	—	—	—	—
	♦ []	3,90	3,90	1,07	0,17	—	—	—	—	—	—
7	♣ Halo	3,50	3,00	2,80	2,40	2,60	2,20	1,30	—	—	—
	♦ []	3,90	1,55	1,07	0,51	0,74	0,35	0,08	—	—	—
8	♣ Halo	3,50	3,50	3,10	2,80	1,50	—	—	—	—	—
	♦ []	3,90	3,90	1,86	1,07	0,10	—	—	—	—	—
9	♣ Halo	3,00	3,50	3,00	2,80	1,50	—	—	—	—	—
	♦ []	1,55	3,90	1,55	1,07	0,10	—	—	—	—	—
10	♣ Halo	3,00	3,00	2,40	2,30	1,40	1,40	1,30	—	—	—
	♦ []	1,55	1,55	0,51	0,43	0,08	0,08	0,08	—	—	—

*n = nº de animales
♣ = halo en cm
♦ = concentración en µg/ml

estos antibióticos en leche. Una buena sensibilidad de esta cepa bacteriana fue también encontrada para otros antibióticos por San Martín y Moraga (1996). Gesche (1986) señala al respecto que "*Bacillus subtilis* BGA es una buena alternativa que concilia la sensibilidad, con el costo y facilidad de aplicación".

Así, por ejemplo, diferentes autores recomiendan esta técnica en el estudio de estos *períodos de resguardo* en diferentes fluidos biológicos de origen animal, en este caso la leche, independiente de la cepa bacteriana que se utilice, dado que además de presentar una adecuada confiabilidad en su sensibilidad, se considera práctica y económica (Cullor y col., 1992; Nouws y col., 1994; Gilbertson y col., 1995; Hernández y col., 1997).

Esta metodología también se utiliza para el control de residuos violativos en el producto final. Es así, por ejemplo, que en países de la U.E. se utiliza como método oficial en el "control primario" de residuos de antibióticos en tejido renal, muscular y además leche (León y Weaver, 1992; Sischo y Burns, 1993; Koenen y col., 1995). Morétain (1997) señala, al respecto, que para los

análisis asociados al pago de la leche a los productores y para las necesidades de las industrias debería efectuarse un control "primario" general, cualitativo, rápido y económico cuyo único requisito sea garantizar una precisión como mínimo igual a los LMR.

Uno de los inconvenientes de esta técnica es la presencia de resultados falsos positivos, que pueden ocurrir por la presencia de inhibidores naturales en la leche (Cullor y col., 1992); sin embargo, modificaciones en el ensayo, tales como calentar la muestra para destruir o inactivar estos inhibidores han sido investigadas y utilizadas por varios laboratorios (Carlsson y Bjorck, 1987; Rama y col., 1985; Cullor y col., 1992). De hecho en este ensayo las muestras previas a su análisis fueron tratadas a 100°C por 30 segundos, con el fin de solucionar este inconveniente:

En relación a la definición de los *períodos de resguardo*, en seis de los ocho grupos tratados los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con la información entregada por la literatura. Así, por ejemplo, para el grupo D al cual se le administró pirlimicina, éste se definió a las 36 horas considerando que el LMR (límite máximo residual) para este antimicro-

CUADRO 5
CONCENTRACIÓN EN FUNCIÓN DEL TIEMPO DE PIRLIMICINA EN LECHE,
DESPUÉS DE HABER ADMINISTRADO EL ÚLTIMO POMO INTRAMAMARIO.
(GRUPO D)

TABLE 5
TIME RELATED CONCENTRATION OF PIRLIMYCIN IN MILK, AFTER THE
ADMINISTRATION OF THE LAST INTRAMAMMARY POMMEL.
(GROUP D)

*n		Horas											
		8	16	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60
1	♣ Halo	2,30	2,00	2,00	2,40	1,70	*	*	—	—	—	—	—
	♦ []	2,81	0,94	0,94	4,06	0,31							
2	♣ Halo	2,20	2,00	2,00	1,70	*	*	—	—	—	—	—	—
	♦ []	1,95	0,94	0,94	0,31								
3	♣ Halo	2,30	2,20	2,00	1,70	*	*	—	—	—	—	—	—
	♦ []	2,81	1,95	0,94	0,31								
4	♣ Halo	2,20	1,90	1,70	*	*	—	—	—	—	—	—	—
	♦ []	1,95	0,65	0,31									
5	♣ Halo	2,40	1,90	1,80	1,50	1,70	*	*	—	—	—	—	—
	♦ []	4,06	0,65	0,45	0,15	0,31							
6	♣ Halo	2,20	2,60	2,10	*	*	—	—	—	—	—	—	—
	♦ []	1,95	8,43	1,35									
7	♣ Halo	2,40	2,10	1,70	*	*	*	—	—	—	—	—	—
	♦ []	4,06	1,35	0,31									
8	♣ Halo	2,30	1,70	*	*	*	—	—	—	—	—	—	—
	♦ []	2,81	0,31										
9	♣ Halo	2,40	1,70	*	*	—	—	—	—	—	—	—	—
	♦ []	4,06	0,31										
10	♣ Halo	2,20	1,80	*	*	*	—	—	—	—	—	—	—
	♦ []	1,95	0,45										

*n = nº de animales

♣ = halo en cm

♦ = concentración en µg/ml

* = las muestras presentan concentración de antibióticos inferior a su LMR (inferior a 0,3 µg/ml)

biano sugerido por el FDA es de 0,3 µg/ml (Boeckman y Carlsson, 1996).

Es importante analizar el caso particular de cefoperazona, ya que en este trabajo en las 2 fórmulas farmacéuticas estudiadas, provenientes de diferentes laboratorios (grupos A y B), el *período de resguardo* definido en leche fue mayor al recomendado por los laboratorios. Al respecto el Vademecum Veterinario de Chile (1995-1996) señala que el *período de resguardo* de esta droga es de 48 a 72 horas, dependiendo del laboratorio fabricante.

Sin embargo, nuestros resultados de 84 y 108 horas para los grupos A y B respectivamente, son coincidentes con los encontrados en la literatura. Wilson y Gilbert (1986) señalan que cefoperazona aplicada vía intramamaria puede ser excretada por la ubre por un período de hasta 5 días (120 horas) después de finalizada la terapia; valores semejantes son descritos por Booth (1986) indicando que para cefoperazona este período es de 84 horas.

Considerando que los *períodos de resguardo* se definen después de finalizada la última terapia, independiente si se aplicó una o más dosis y que en las dos fórmulas farmacéuticas analizadas en este trabajo existía igual concentración de droga, podría ser que esta variación esté relacionada con los excipientes en los que se vehiculizó la droga, ya que no se conocen los datos de éstos. La literatura indica que las formulaciones influyen en la liberación y eliminación de un fármaco y que cambios en ella afectan los períodos de resguardo (Oliver y col., 1990; Riviere, 1991). Si bien es cierto no se encontraron datos específicos para cefoperazona vehiculizada en diferentes excipientes, podemos sí mencionar otras drogas. Así, por ejemplo, Morétain (1997) señala que el *período de resguardo* para clortetraciclina es de 26 ordeñas si el vehículo es un excipiente no miscible, disminuyendo a 5 ordeñas en un excipiente lactodispersable.

Es difícil dar una explicación única a nuestros resultados, ya que además la literatura señala que aun

cuando los antibióticos se utilicen de acuerdo a las instrucciones dadas por las industrias farmacéuticas e indicadas en el rotulado, éstos pueden seguir eliminándose en concentraciones mayores a los LMR por un lapso de tiempo mayor a los *períodos de resguardo* establecidos. Mc Ewen y col. (1992), en un trabajo realizado con 70 animales tratados en forma adecuada, reportaron que en 3 de ellos se observó la presencia de concentraciones violativas de antibióticos por un lapso mayor a los establecidos. Por otro lado Seymour y col. (1988) reportaron que una alta proporción de vacas que fueron tratadas con cefapirina acorde a las instrucciones del rotulado (antibiótico perteneciente al mismo grupo de cefoperazona), fueron positivas al test de residuos en leche después de finalizado el *período de resguardo*.

Quizás es importante también mencionar que en nuestro país sólo a partir de diciembre del año 1995 el "Reglamento de Productos Farmacéuticos de Uso Exclusivamente Veterinario" hace obligatoria a las industrias farmacéuticas entregar información avalada científicamente por este parámetro, e incorporar este dato en el etiquetado. A partir de esa fecha sólo se ha registrado un producto de los estudiados en este trabajo.

Por otro lado, si se analizan los resultados de todos los grupos en conjunto, podemos observar una variabilidad individual en la duración de los *períodos de resguardo*. De los 80 animales utilizados en este estudio en 42 de ellos (52,5%) se pudo definir este parámetro en relación al momento (hora) en que las muestras de leche se hicieron negativas observándose en 38 (47,5%) tiempos de eliminación menores. Es importante señalar que aun cuando todos los animales utilizados en este trabajo cursaron con mastitis clínica, no en todos ellos la gravedad del cuadro fue igual, situación a la cual podríamos atribuir estas diferencias.

Al respecto, algunos investigadores, como es el caso de Prescott y Baggot (1988), señalan que esta variabilidad individual puede estar asociada a diferencias fisiológicas entre los individuos, como también a la severidad de los síntomas clínicos. Van Miert (1990) sugiere que los *períodos de resguardo* pueden en algunas circunstancias necesitar un ajuste de acuerdo a la severidad de la enfermedad, ya que los procesos de absorción, distribución, fijación y eliminación se pueden ver afectados. Así también Ziv ya en el año 1980 señaló que estas variables farmacocinéticas influyen sobre la concentración del fármaco en la leche y en el tejido mamario.

Finalmente es necesario hacer énfasis en que la información de los *períodos de resguardo* entregados en este trabajo no era de carácter obligatorio para aquellos productos farmacéuticos registrados con an-

terioridad al año 1995 en nuestro país, como se señaló anteriormente, y por lo tanto puede que en algunas de las fórmulas farmacéuticas utilizadas en este estudio esta información no sea conocida por los Médicos Veterinarios de terreno. Además es importante destacar que los *períodos de resguardo* obtenidos en este trabajo sólo son válidos para las dosis y esquemas terapéuticos realizados en cada grupo; éstas se realizaron de acuerdo a las instrucciones dadas por los diferentes laboratorios. Cualquier modificación en el uso de estas drogas afecta la duración de estos períodos en proporciones más o menos importantes como ha sido señalado por diferentes investigadores (Moré-tain, 1997), haciéndose énfasis en que una de las causas de residuos violativos en la leche se debe al no respeto de las instrucciones del etiquetado dados por las industrias farmacéuticas (Guest y Paige, 1991; Cullor y col., 1992).

RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó el *período de resguardo* en leche de 8 diferentes fórmulas farmacéuticas con antibióticos de aplicación intramamaria. Cuatro de ellas contenían un solo antibiótico en su formulación (monodrogas) y las restantes contenían más de un antibiótico (asociaciones). Para cada formulación se utilizaron 10 vacas con mastitis clínica provenientes de diferentes predios lecheros de la Región Metropolitana; todas las formulaciones fueron administradas de acuerdo a las instrucciones dadas por los laboratorios.

Para los análisis en el laboratorio se utilizó la Técnica Microbiológica de Cilindros en Placa utilizando como cepa bacteriana *Bacillus subtilis* BGA; esta técnica presentó una sensibilidad de 0,08 µg/ml para cefoperazona y cefacetil y de 0,04 µg/ml para pirlimicina.

En las monodrogas se cuantificó las concentraciones en función del tiempo; para esto se elaboraron curvas de referencia con droga pura y la ecuación resultante del análisis de regresión lineal de ésta se utilizó para transformar los halos de inhibición que están expresados en cm a unidades de concentración (µg/ml).

En las asociaciones sólo se pudo dar un resultado cualitativo, ya que la técnica utilizada no identifica antibióticos en forma individual; este resultado se expresó como presencia o ausencia de antibióticos de acuerdo a los niveles de sensibilidad de la técnica.

Para cefoperazona los *períodos de resguardo* se definieron a las 84 y 108 horas para los grupos A y B respectivamente. Para cefacetil y pirlimicina éstos

tuvieron una duración de 96 y 36 horas respectivamente.

Para las fórmulas farmacéuticas con asociaciones de lincomicina / neomicina, penicilinaGsódica / dihidroestreptomocina / nafcillin y penicilinaGprocaína / noboviocina / polimixinaB / dihidroestreptomocina los *períodos de resguardo* fueron de 72 horas. Para la asociación espiramicina/neomicina fue de 96 horas.

BIBLIOGRAFÍA

- AERTS, M.M.; A.C. HOGENBOOM; U.A. BRINKMAN. 1995. Analytical strategies for the screening of veterinary drugs and their residues in edible products. *J. Chromatogr B. Biomed. Appl.* May 5; 667(1): 1-40.
- Association of Official Analytical Chemist (A.O.C.C., 1984). Official Methods of analysis. 14^a de Assoc. Offic. Anal. Chem. Arlington. V.A.
- BERRIDGE, N.J. 1956. Penicillin in milk. I. The rapid routine assay of low concentrations of penicillin in milk. *J. Dairy Res.* 23: 336-341.
- BOECKMAN, S.; K.R. CARLSON. 1996. Milk and Dairy Beef Residue Prevention protocol. Producer Manual. Publisher: Agri-Education, Inc. 801 Shakespeare Ave. Stratford, IA 50249. 515-838-2793 or 1-800-55-DAIRY.
- BOOTH, J.M. 1986. Intramammary antibiotic preparations and their with holding times. *Vet Rec.* (11) 34-35.
- CARLSSON, A.; L. BJORCK. 1987. The effect of some indigenous antibacterial factor in milk on the growth of *Bacillus Stearothermophilus* var. *Calidolactis*. *Milchwissenschaft.* 42: 282-285.
- CULLOR, J.S.; A. VAN EENENNAAM; J. DELLINGER; L. PERANI; W. SMITH; L. JENSEN. 1992. Antibiotic residue assays: Can they be used to test milk from individual cows? *Vet Med.* 87(5): 477-494.
- Diario Oficial de las Comunidades Europeas, Reglamento N° 2377/90, 28/1/96.
- Diario Oficial de Chile, 1996. Diario Oficial, 10-diciembre-1996, Resolución exenta N° 3399, Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), Ministerio de Agricultura, Chile.
- FAO/WHO. 1995. Evaluation of certain veterinary drug residues in food. Forty-third report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. *World Health Organ Tech Rep Ser.* 855: 1-59.
- Food and drug administration (FDA), 1991. Tolerance and/or safe levels of animal drug residues in milk. Maryland (U.S.A.) Department of Health and Human Service. pp. 1-2.
- GESCHE, E. 1986. Detección de residuos de antibacterianos en carne. Técnicas del *Bacillus subtilis* BGA. *Monografías Med. Vet.* 8(1): 1-5.
- GUEST, G.B.; PAIGE, C. 1991. The magnitude of the tissue residue problems with regard to consumer needs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 198(5): 805-808.
- GILBERTSON, T.J.; R.L. MEJEUR; S. YEINF; P.S. JAGLAN. 1995. Modified microbiological method for the screening of antibiotics in milk. *J. Dairy Sci.* 78(5): 1032-1038.
- HERNÁNDEZ, J.; V. CALDERÓN; R. ARAUJO; M. COUCEIRO; J. GONZÁLEZ; P. DIEZ; J.A. BERENGUER. 1997. Preliminary identification of antibiotic residues in milk. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 20 (Suppl. 1), pág. 11.
- KOENEN-DIERICK, K.; L. OKERMAN; L. ZUTTER; J.M. DE-GROODT; J. VAN HOOF; S. SREBRNIK. 1995. A one plate microbiological screening test for antibiotic residue testing in kidney tissue and meat; an alternative to the EEC four-plate method? *Food Addit Contam.* Jan-Feb.; 12(1): 77-82.
- JONES, P.G.H. 1997. Regulatory harmonization for veterinary medicines in the European Union. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 20 (Suppl. 1) pp. 1-9.
- LENNETT, E.H. 1985. *Manual of Clinical Microbiology* 4th Ed. American Society for Microbiology. Washington DC.
- LEÓN, D.; V.M.D. WEAVER. 1992. Antibiotic residues in milk and meat: Perceptions and realities. *Vet. Med.* 1 Dic. 1992.
- MC EWEN, S.A.; W.D. BLACK; A.H. MEEK. 1991. Antibiotic residue prevention methods, for management, and occurrence of antibiotic residues in milk. *J. Dairy Sci.* 74(7): 2128-2137.
- MC EWEN, S.A.; W.D. BLACK; A.H. MEEK. 1992. Antibiotic residues (bacterial inhibitory substances) in the milk of cows treated under label and extra label conditions. *Can Vet. J.* 33: 527-534.
- MORÉTAÍN, J.P.; S. LOUSSOUARN; E. DE ESTEVEZ; J. BOISSEAU. 1983. Élimination des Résidus D Antibiotiques dans le Lait: les Tétraciclines. *Rec. Med. Vet.* Vol. 195(5): 473-480.
- MORÉTAÍN, J.P.; J. BOISSEAU. 1993. Elimination of aminoglycoside antibiotics in milk following intramammary administration. *Vet. Q.* 15(3): 112-117.
- MORÉTAÍN, J.P. 1997. Eliminación de los medicamentos veterinarios en la leche. *Producción Animal.* Junio N° 123, pp. 11-22. National mastitis council. 1990.
- NOUWS, J.F.; H. KULPER; B. VAN KLINGEREN; P.G. KRUYSWLJK. 1994. Establishment of a microbiologically acceptable daily intake of antibiotic drug residues. *Vet. Q.* 16(3): 152-156.
- OLIVER, S.P.; J.L. MAKI; H.H. DOWLER. 1990. Antibiotic residues in milk following antibiotic therapy during lactation. *J. Food. Prot.* 53(8): 693-696.
- PRESCOTT, J.F. y J.D. BAGGOT, 1988. *Terapéutica Antimicrobiana Veterinaria.* Zaragoza (España), Acribia, pp. 393-398.
- RAMA, Y.; S. RAM; A. SANJEEN. 1985. Diffusion test for the detection of streptomycin residues in milk. *J. Dairy Res.* 52: 595-597.
- RIVIERE, J.E. 1991. Pharmacologic principles of residue avoidance for veterinary practitioners. *JAVMA.* Vol. 198 N° 5, March 1. pp. 809-815.
- SAN MARTÍN, B.; R. MORAGA. 1996. Evaluación de la técnica microbiológica con *Bacillus subtilis* BGA para la identificación de residuos de antibióticos en leche bovina. *Av. Cs. Vet.* 11(1): 43-48.
- SCHEFLER, W.C. 1981. *Bioestadística.* 2ª Ed. Fondo Educativo Interamericano, S.A., México.
- SEYMOUR, E.H.; G.M. JONES; L. Mc GILLIARD, 1988. Persistence of Residues in Milk Following Antibiotic Treatment of Dairy Cattle. *J. Dairy Sci.* 71: 2292-2296.
- SETTEPANI, J.A. 1984. The hazard of using chloramphenicol in food animal. *J. Am. Med. Assoc.* 184: 930.
- SISCHO, W.M.; B.S. BURNS. 1993. Field trial of four cowside antibiotic residue screening tests. *J. Am. Vet. Assoc.* pp. 1249-1254.
- SCOTT, A.; S.A. MC EWEN; D.B. WILLIAM; H.M. ALAN. 1992. Antibiotic residues (bacterial inhibitory substances) in the milk of cows treated under label and extra label conditions. *Can Vet. J.* V. 33.
- Vademecum Veterinario de Chile (1995-1996). 4ª edición. Edit. Publicaciones Médicas y Cía. Ltda. pp. 26 y 116.
- VAN MIERT ASJPAM. 1990. Influence of febrile disease on the pharmacokinetics of veterinary drugs. *Ann Rech Vet.* 21(1): 11-28.
- WILSON, C.D.; GILBERT, G.A. 1986. Pharmacokinetics of cefoperazone in the cow by the intramammary route and its effect on mastitis pathogens in vitro. *Vet Rec.* 118(22): 607-609.
- ZIV, G. 1980. Drug selection and use in mastitis: systemic vs local drug therapy. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 176: 1109.