

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

**ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS EXCIPIENTES USADOS EN LA FORMULACIÓN
DE ANTIBIÓTICOS DE APLICACIÓN INTRAMAMARIA SOBRE EL RECuento
CELULAR Y LOS TIEMPOS DE ESPERA EN LECHE**

por

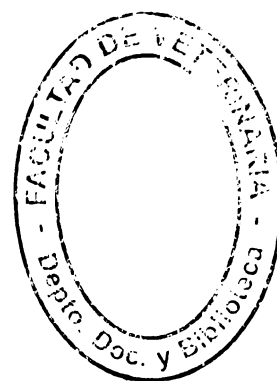
Carlos Mauricio, NIELL ALONSO
María Eugenia, ALZAGA BACEDA

TG 148

Estudio del efecto



FV/28367



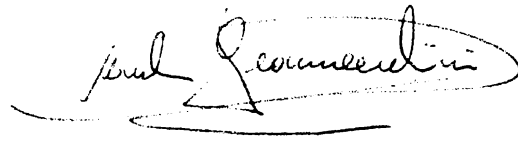
TESIS DE GRADO presentada como uno de
los requisitos para obtener el título de Doctor
en Ciencias Veterinarias
Orientación: Producción Animal

MODALIDAD: Ensayo experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2009**



TESIS DE GRADO aprobado por:



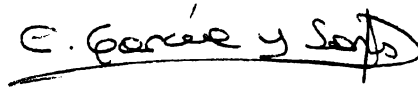
Presidente de mesa:

Dr. Edgardo Giannechini



Segundo Miembro (Tutor):

Dra. Elena de Torres



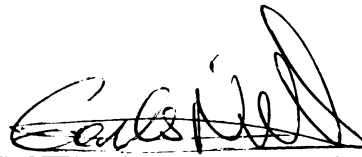
Tercer Miembro:

Dra. Carmen García y Santos

Fecha:

22 / 12 / 2009

Autores:



Carlos Mauricio Niell Alonso

Maria Eugenia Alzaga Baceda

FACULTAD DE VETERINARIA

Aprobado con 8 (ocho) 

28.367

AGRADECIMIENTOS

Estamos llegando al final de lo que será un principio: final de nuestra carrera, y principio del desempeño de ella

En este momento importante como lo es la entrega del último trabajo, queremos agradecer el apoyo invaluable y la contención de mucha gente que estuvo a nuestro lado en los buenos momentos y también en los difíciles a lo largo de todos estos años.

Entre ellos: A nuestros padres Enrique y Marta, Adriana y Jorge por su constante esfuerzo y apoyo incondicional, así como a nuestros hermanos y amigos por su apoyo y amistad, principalmente a Gladis Alonso por estar permanentemente pendiente nuestro.

Especialmente a nuestra tutora, Dra. Elena de Torres, por “estar siempre ahí”, por su paciencia, dedicación y principalmente por la confianza puesta en nosotros y todo lo enseñado en este camino al hacer nuestro trabajo final.

A Alfonso, Eduardo, Lucrecia y Ana por la ayuda brindada y a Laura Rifran por todo su apoyo y comprensión.

Al Dr. Fernando Vila, a Leonardo Acosta, a la Dra. Mette Bouman y al personal de biblioteca por su disposición y buena voluntad.

A Adriana y José Luis, del campo experimental N° 2 de Facultad de Veterinaria porque allí trabajamos para nuestra tesis, por su apoyo, colaboración, por los buenos momentos pasados en su compañía y por todo lo que aprendimos ahí gracias a ellos en el trabajo del día a día.

A nuestros compañeros de Facultad por los años vividos que han marcado una huella importante en nuestra vida.

A todos los que hicieron que este momento llegara ¡¡¡¡¡ MUCHAS GRACIAS!!!!!!!!!!!!

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

	PÁGINA
1. Correlación entre CMT y Células Somáticas.....	8
2. Límites Máximos Residuales (LMR).....	15
3. Tiempo de espera de antibiótico en leche por ensayo.....	25
4. Referencias económicas utilizadas para calcular las pérdidas producidas por ensayo...	25
5. Promedio y Desvío de lts / vaca del total de ensayos	25
6. Estimación en dólares de las pérdidas de leche por ensayo	25
7. RCS por cuarto utilizados para realizar el Test de t 1 en el grupo tratamiento.....	27
8. RCS por cuarto utilizados para realizar el Test de t 1 en el grupo control.....	28
9. RCS por cuarto utilizados para realizar el Test de t 3 para comparar primer y último ordeño del grupo tratamiento y control.....	29
10. RCS por cuarto utilizados para realizar el Test de t 3 para comparar el último ordeño del grupo tratamiento y control.....	30
11. RCS por cuarto utilizados para realizar el Test de t 1 en el grupo tratamiento.....	31
12. RCS por cuarto utilizados para realizar el Test de t 1 en el grupo control.....	32
13. RCS por cuarto utilizados para realizar el Test de t 3 para comparar el primer y último ordeño del grupo tratamiento y control.....	33
14. RCS por cuarto utilizados para realizar el Test de t 3 para comparar el último ordeño del grupo tratamiento y control.....	34
15. RCS por cuarto utilizados para realizar el Test de t 1 en el grupo tratamiento.....	35
16. RCS por cuarto utilizados para realizar el Test de t 1 en el grupo control.....	35
17. RCS por cuarto utilizados para realizar el Test de t 3 para comparar primer y último ordeño del grupo tratamiento y control	36
18. RCS por cuarto utilizados para realizar el Test de t 3 para comparar el último ordeño del grupo tratamiento y control.....	36
19. RCS por cuarto utilizados para realizar el Test de t 1 en el grupo tratamiento.....	37
20. RCS por cuarto utilizados para realizar el Test de t 1 en el grupo control.....	38
21. RCS por cuarto utilizados para realizar el Test de t 3 para comparar primer y último ordeño del grupo tratamiento y control	39
22. RCS por cuarto utilizados para realizar el Test de t 3 para comparar el último ordeño del grupo tratamiento y control	40
23. RCS por cuarto utilizados para realizar el Test de t 1 en el grupo tratamiento.....	41
24. RCS por cuarto utilizados para realizar el Test de t 1 en el grupo control.....	41
25. RCS por cuarto utilizados para realizar el Test de t 3 para comparar primer y último ordeño del grupo tratamiento y control.....	42
26. RCS por cuarto utilizados para realizar el Test de t 3 para comparar el último ordeño del grupo tratamiento y control	42
27. Comparación entre CMT y RCS.....	50

LISTA DE FIGURAS

	PÁGINA
1. Lectura de colores del Delvotest.....	14

TABLA DE CONTENIDO



	PÁGINA
PÁGINA DE APROBACIÓN	I
AGRADECIMIENTOS	II
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS	III
1. RESUMEN.....	1
2. SUMMARY.....	2
3. INTRODUCCIÓN.....	3
4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
4.1. ASPECTOS GENERALES DE MASTITIS.....	5
4.1.1. Importancia de la mastitis.....	5
4.1.2. Clasificación de la Mastitis.....	5
4.1.3. Agentes causales de mastitis.....	6
4.1.4. Métodos de diagnóstico para mastitis.....	7
4.2. TRATAMIENTO ANTIMICROBIANO.....	8
4.2.1. Mecanismo de Acción.....	9
4.2.2. Clasificación.....	9
4.2.3. Susceptibilidad de los principales agentes causales de mastitis en nuestro país a los antibióticos.....	10
4.3. TIEMPO DE RETIRADA DE ANTIBIÓTICO EN LECHE.....	11
4.3.1. Efectos en la Salud Pública.....	11
4.3.2. Problemas Tecnológicos.....	12
4.3.3. Repercusiones en los productores.....	12
4.4. REGLAMENTACIÓN RESPECTO A LA PRESENCIA DE ANTIMICROBIANOS EN ALIMENTOS.....	13
4.4.1. Método de detección de inhibidores en leche.....	14
4.4.2. Límites máximos residuales (LMR).....	15
4.4.3. Propuestas generales para la inspección de los residuos.....	15
4.5. NATURALEZA DE LOS ANTIBIÓTICOS USADOS.....	16
4.6. EXCIPIENTE.....	18
4.6.1. Definición.....	18
4.6.2. Funciones.....	18
4.6.3. Productos de aplicación intramamaria.....	18
5. HIPÓTESIS.....	20
6. OBJETIVOS.....	20
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
7.1. LOCALIZACIÓN DEL ESTUDIO.....	20
7.2. MATERIALES.....	20
7.3. LIMITACIONES METODOLÓGICAS.....	21
7.4. METODOLOGÍA.....	22
7.4.1. Selección de animales.....	22
7.4.2. Ensayos.....	22
7.4.3. Procedimiento para Administración de pomos intramamarios.....	23
7.4.4. ENSAYO N° 1.....	23
7.4.5. ENSAYO N° 2.....	23
7.4.6. ENSAYO N° 3.....	23
7.4.7. ENSAYO N° 4.....	23
7.4.8. ENSAYO N° 5.....	23
7.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	24

8. RESULTADOS.....	25
8.1. ENSAYO N° 1.....	26
8.2. ENSAYO N° 2.....	31
8.3. ENSAYO N° 3.....	35
8.4. ENSAYO N° 4.....	37
8.5. ENSAYO N° 5.....	41
9. DISCUSIÓN.....	43
10. CONCLUSIONES.....	44
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
12. ANEXOS.....	50

1. RESUMEN

En el presente trabajo se estudió el tiempo de espera en leche de una formulación de antibióticos de aplicación intramamaria y su efecto en la salud de la ubre a través del recuento de células somáticas en vacas de raza Holando y cruce Holando-Jersey. Este estudio se llevó a cabo en el Campo Experimental N° 2 de la Facultad de Veterinaria - UDELAR, ubicado en el Departamento de San José.

Para ello se llevaron a cabo cinco ensayos en los que se formularon distintos pomos de antibiótico donde se mantuvieron las mismas drogas y se variaron los excipientes. Los antibióticos utilizados fueron penicilina G sódica y cloxacilina sódica, en cantidades de 300.000 UI y 200 miligramos respectivamente. Los excipientes utilizados en las distintas formulaciones fueron en base a parafina líquida y sólida (en distintos grados de asociación), alcohol cetosteárico y parafina con emulgente no iónico. En todos los ensayos la metodología aplicada fue la misma.

Para llevar a cabo estos se seleccionaron un total de 40 vacas de la raza Holando y cruce Holando-Jersey. La selección de los animales fue realizada en base a un recuento de células somáticas menor o igual a 200.000 cél/ml en leche, y una producción entre nueve y veinticinco litros diarios en los tres meses previos al comienzo del estudio. En cada ensayo se aplicaron los pomos intramamarios formulados en 4 ordeñes consecutivos, antes de la aplicación de los mismos se tomaron muestras de leche para la determinación del RCS y se les realizó un CMT a todos los animales de cada ensayo, una segunda muestra fue tomada al finalizar el tratamiento. Luego del último tratamiento se comenzaron a tomar muestras diarias estériles para la determinación de residuos de antibióticos en leche por medio del Delvotest®. Los excipientes utilizados en la formulación de los pomos de administración intramamaria no causaron signos de irritación.

2. SUMMARY

The withdrawal time in milk of an antibiotic formulation for intramammary application and its effect on udder health determined by somatic cell count in Holstein-breed and Holstein-Jersey crossbreed cows, were studied in the present study. This work was carried out at the Experimental Farm No.2 of the Veterinary Faculty-UDELAR, located in San José.

For this purpose different antibiotic syringe were formulated where the same drugs remained but the excipients were different. The antibiotics used were penicillin G sodium and cloxacillin sodium, in quantities of 300,000 IU and 200 mg respectively.

Whereas, the excipients used in the different formulations were based on solid and liquid paraffin (in different degrees of association); monoglyceride acetylated alcohol and paraffin cetoesteárico non-ionic emulsifier. Five trials were performed and the methodology applied in all was the same. The animal selection was according to the somatic cell count level and milk production. Three monthly SCC and milk production determinations before the trial, were performed. Forty cows with $\leq 200\ 000$ cells/ml and daily yields between nine and twenty five liters of milk were selected.

The implementation of the intramammary treatment was performed during four consecutive milks. Samples for SCC were collected before treatment and after the last intramammary application. Whereas, aseptic daily samples to determine antibiotic residues in milk by means Delvotest®, were collected after last treatment.

Regarding the withdrawal time, this was influenced by the type of excipient used.

The excipients used in the formulation of the intramammary administration of syringe caused no signs of irritation in the udder of selected cows.

3. INTRODUCCIÓN

Uruguay, dada su ubicación geográfica presenta excelentes condiciones naturales en materia de suelos y un clima templado con más del 80 % de su territorio con aptitud agropecuaria, lo que lo hacen un país extremadamente apto para la producción de leche (Uruguay, 2009).

La producción de leche ha crecido constantemente en los últimos 25 años, a una tasa promedio anual del 5%, cifra que se elevó a un promedio del 6% en la década de los '90. Uruguay es el mayor productor de leche per cápita de América Latina, con 412 litros por habitante. Tiene un alto consumo por habitante y por año, que también lo ubica en primer lugar (228 lts/hab/año) (Uruguay, 2009).

Destina una superficie total de 874.000 hectáreas para la producción lechera, el total de vacunos lecheros es de 743.000 cabezas. Existen un total de 4.625 productores lecheros, de los cuales 3.403 remiten a planta, con una producción anual de 1.328 millones de litros (DIEA, 2008 a).

Desde comienzos de la década del 90 se inició un fuerte proceso de mejora de la calidad a través de un Sistema Nacional de Calidad de la Leche y hoy día se ha logrado que el 90% de la misma tenga un nivel de calidad superior (menor a 800.000 células/ml) (Uruguay, 2009).

Se define como calidad higiénica de la leche al número total de bacterias vivas que desarrollan colonias expresadas por mililitro en una muestra de leche de tanque (UFC/ml) y da una idea del nivel de higiene general del tambo (Uruguay, 2009).

Por otro lado la calidad sanitaria se define como el número de células somáticas en una muestra de leche de tanque expresado en cél/ml (RCS/ml). Está relacionada a la salud de la ubre (Uruguay, 2009).

En lo que respecta al mercado internacional en los Estados Unidos de América (EUA) y la comunidad Europea (CEE) poseen decretos que regulan el límite superior de recuento de células somáticas (RCS) permitidos. La CEE (ordenanza 92/46/CEE) ha establecido un límite de 400.000 cél/ml, mientras que en los EUA la Ordenanza de Leche Pasteurizada (PMO) ha establecido el límite en 750.000 cél/ml para recibir la leche producida (Giannechini y col, 2001).

Desde 1996 en Uruguay se instauró el Sistema Nacional de Calidad de Leche y dentro de las últimas resoluciones gubernamentales se encuentra fijado el límite de RCS para la categoría superior de calidad en 800.000 cél/ml (OPYPA, 2001 citado por Giannechini y col, 2001).

Dentro de esa categoría superior, las plantas establecen diferentes criterios para el pago de bonificaciones. Por ejemplo CONAPROLE en el 2002 fija tres categorías dentro de los límites dados por el gobierno: con un RCS menor a 400.000 cél/ml otorga un 18% de bonificación sobre el precio base, con un RCS entre 400.000 y 500.000 cél/ml otorga un 15% de bonificación, y finalmente con RCS entre 500.000 y 800.000 cél/ml otorga un 10% de bonificación (Giannechini y col., 2002).

Considerando el hecho de que la mastitis es una enfermedad muy compleja, causada por muchos microorganismos y por la acción de numerosos factores de manejo, medio ambiente etc., debemos hacer hincapié en el control de la enfermedad antes que en la erradicación.



El control incluye una serie de 5 pasos, que son los siguientes:

1. Utilizar máquinas ordeñadoras funcionalmente adecuadas y de la manera correcta.
2. Sellar las tetas después del ordeño con un producto efectivo.
3. Administrar a tiempo una serie completa de tratamientos recomendados a todos los casos clínicos.
4. Tratar los cuartos de cada vaca en el secado con preparados antibióticos de formulación especial, y que se encuentren disponibles comercialmente.
5. Separar y vender los animales con infecciones crónicas que no responden al tratamiento (Philpot, 1978).

Con la meta de reducir las enormes pérdidas ocasionadas por la enfermedad a nivel mundial el tratamiento antibiótico sigue siendo el procedimiento más común y aceptado para la terapia de la mastitis clínica y subclínica, ya sea durante la lactancia o en el período de secado. Pero hay que tener en cuenta los problemas que puede causar la presencia de antibióticos en leche en la industria y en la salud pública.

Es de gran importancia que las presentaciones antibióticas antes de salir al mercado sean evaluadas con el fin de corroborar los tiempos de espera de antibiótico en leche y los efectos secundarios que éstos pueden causar en la salud de la ubre.

En este trabajo se realizará uno de los pasos para la formulación de un pommo de aplicación intramamario en el que se evalúa el efecto de los excipientes sobre el tiempo de espera del antibiótico en leche y el efecto de los excipientes sobre la salud de la ubre evaluado a través del recuento de células somáticas por cuarto mamario.

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1. ASPECTOS GENERALES DE MASTITIS

4.1.1. Importancia de la mastitis

El término mastitis deriva de las palabras griegas “mastos”, que significa “mama” e “itis” que quiere decir “inflamación de” (Chaffer y Saran, 2000). La inflamación es la respuesta de los tejidos en la ubre a una lesión traumática o la presencia de microorganismos infecciosos que han ingresado a la ubre. El propósito de la respuesta inflamatoria es destruir o neutralizar el agente ofensivo, reparar los tejidos dañados y retornar la glándula a su función normal (Philpot y Nickerson, 1992).

Clásicamente se la ha definido como una “enfermedad polifactorial”, porque el riesgo de infección depende de la habilidad de la vaca para rechazarla, del tipo, número y patogenicidad de las bacterias presentes en un rodeo y fundamentalmente de las condiciones del medio ambiente y del manejo en general del ordeño (Corbellini, 2002).

Las pérdidas directas debidas a casos de mastitis clínicas incluyen pérdidas de leche debido a una sostenida reducción en producción y también a muertes prematuras, refugo o secado temprano; adicionando las pérdidas debidas al descarte de la leche generadas por el tiempo de espera del antibiótico en leche, el costo del tratamiento en sí mismo, incluyendo los honorarios veterinarios, y el costo por trabajos extras con las vacas mastíticas (Fetrow y col, 2000).

Se estima que en Uruguay se estarían produciendo pérdidas anuales de USD 26 millones en producción debido a mastitis (Giannechini y col, 2001).

Según Giannechini y col (2001), la incidencia de mastitis clínica para la cuenca litoral oeste fue de 1.2 casos por cada 100 vacas / mes en riesgo, mientras que la incidencia en un año se estimó en 14.4 vacas / año en riesgo. En la región sur hubo una incidencia de 10.9 casos por cada 100 vacas / año en riesgo (Giannechini y col, 2005).

4.1.2. Clasificación de la Mastitis

Se han descrito muchas formas de presentación de mastitis, incluyéndose entre las principales la mastitis subclínica, clínica, aguda, crónica y gangrenosa, pudiendo variar desde una reacción leve hasta una toxemia grave con signos clínicos manifiestos (Radostitis y col, 2002). Sin embargo, para la mayoría de los autores existen dos formas básicas de presentación; la mastitis clínica y subclínica (Philpot, 1999).

La mastitis subclínica no da lugar a cambios inflamatorios visibles en la ubre y no se observan macroscópicamente anomalías en la leche (Giannechini y col, 2001).

La mastitis clínica se presenta con signos y síntomas observables: hinchazón de uno o más cuartos en la ubre, calor y dolor al contacto y cambios macroscópicos en la leche (presencia de grumos, pus o sangre) (Chaffer y Saran, 2000). La sola presencia de cambios macroscópicos en la leche sin la observación de signos en la ubre, también se la define como

mastitis clínica. La severidad de la mastitis clínica puede variar entre una mastitis leve hasta hiperaguda en la cual se presenta sintomatología sistémica como aumento de temperatura corporal, deshidratación, inapetencia, malestar, en algunos casos puede ser fatal (Chaffer y Saran, 2000).

La mastitis clínica puede ser clasificada según la severidad en: mastitis clínica subaguda y aguda.

Mastitis clínica subaguda: Es caracterizada por cambios en la leche, tales como grumos, coágulos y apariencia acuosa. En la ubre puede ser encontrado algo de calor, inflamación y sensibilidad (Giannechini y col, 2001).

Mastitis clínica aguda: Esta condición de la enfermedad es caracterizada por instauración repentina de la sintomatología, rubor, inflamación, temperatura y dolor en la ubre, también por anomalías groseras en leche y reducción de la producción (Giannechini y col, 2001).

4.1.3. Agentes causales de mastitis

La inflamación de la glándula mamaria puede ser causada por agentes infecciosos y sus toxinas, traumas o productos químicos irritantes (National Mastitis Council, 1996).

Los agentes causales de la mastitis bovina son microorganismos que habitan en la ubre de la vaca y en el medio ambiente. Más de cien microorganismos fueron implicados como causantes de infección intramamaria (Chaffer y Saran, 2000), incluyendo bacterias, micoplasmas, hongos, algas y virus, siendo las bacterias el grupo de mayor importancia (Radostitis y col, 2002).

Tres importantes grupos de patógenos son reconocidos:

- Patógenos contagiosos.
- Patógenos Medio Ambientales.
- Patógenos oportunistas.

Dentro del primer grupo se incluyen: *Staphylococcus aureus* (S. aureus), *Streptococcus agalactiae* (Str. agalactiae), *Streptococcus disgalactiae* (Str. disgalactiae), *Corynebacterium bovis* (C. bovis), *Mycoplasma spp* (Smith y Hogan, 1995).

Las infecciones causadas por éstos patógenos son transmitidas de vaca a vaca, donde los microorganismos son diseminados al rodeo durante el ordeño (Smith y Hogan, 1995).

En el grupo de los Medios Ambientales se encuentran: Str. uberis y Str. disgalactiae, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, y *Enterococcus spp*. Bacterias Gram negativas como *Escherichia coli* (E. coli), *Klebsiella spp*, *Enterobacter spp*, *Serratia spp*, *Pseudomonas spp*, *Proteus spp*, *Citrobacter spp* (Smith y Hogan, 1995).

La incidencia de estas infecciones está directamente influenciada por las estaciones del año (Hogan y col, 1989 a y b). Las condiciones de barro en áreas donde las vacas son congregadas en las instalaciones alrededor de la sala de ordeño, pueden contribuir significativamente en el aumento de este tipo de mastitis durante las estaciones de lluvia (Smith y Hogan, 1995).

En el último grupo prevalecen *S. chromogenes* y *S. hyicus*. Éstos son parte de la flora normal de los bovinos en fosas nasales, pelo, vagina, piel de la teta, canal del pezón y muestras de leche (Smith y Hogan, 1995).

Más del 90% de los cuadros de mastitis clínica y subclínica son causados por: *S. aureus*, *Str. agalactiae*, *Str. dysgalactiae* y *Str. uberis* (Philpot, 1978), aunque han adquirido cada vez más importancia bacterias Gram negativas como *E. coli*, *Staphylococcus coagulasa negativo* (SCN), *C. bovis* (Radostitis y col, 2002).

En nuestro país los microorganismos aislados de mastitis clínica fueron principalmente *S. aureus* (37.5%) y *E. coli* (12.5%). Los porcentajes de otros patógenos aislados fueron: SCN 7.5%, *Str. agalactiae* 5% y *Str. medioambientales* 5%, con 32.5% de los cultivos negativos (Giannechini y col, 2001).

4.1.4. Métodos de diagnóstico para mastitis

El diagnóstico de mastitis clínica se puede hacer a través de la observación de ciertos parámetros como: alteración de la leche, examen clínico de la ubre y el cuarto mamario hinchado luego del ordeño (Blowey y Edmondson, 1995).

El diagnóstico de mastitis subclínica se puede hacer a través del recuento celular. El recuento de células somáticas (RCS) es la presencia de células en leche. Se utiliza como indicador de inflamación en la ubre. Las células somáticas (CS) están constituidas por una asociación de leucocitos y células epiteliales. Los leucocitos pasan a la leche en respuesta a la inflamación que puede aparecer debido a una enfermedad o a veces a una lesión. Los leucocitos constituyen casi la totalidad (98 – 99%) de las CS (Blowey y Edmondson, 1995).

El monitoreo de CS puede hacerse individualmente por cuarto, por vaca, (leche compuesta) o por muestreo de leche del tanque (leche mezcla).

A nivel de la vaca, el RCS es usado para determinar si una vaca o cuarto individual tiene mastitis; mientras que a nivel de tanque solo se podrá estimar el estado de salud promedio de todo un rodeo (Smith, 1996).

En nuestro país las técnicas que se emplean para diagnóstico son: a nivel de campo el California Mastitis Test (CMT), método indirecto de recuento celular y en el laboratorio se realiza el recuento celular directo por medio de diferentes equipos (Somacount, Fossomatic).

El Somacount 300® es un instrumento preciso y confiable, que funciona con exactitud y eficiencia en el conteo de células somáticas en leche. Utiliza la citometría de flujo para el análisis de 300 muestras por hora como mínimo. Este instrumento de tecnología láser utiliza bromuro de ethidium (colorante) para teñir el ADN de los glóbulos blancos de la sangre. La sección de conteo utiliza las características de fluorescencia del colorante, que emite luz roja cuando se lo expone a luz verde. Un sistema óptico automático, sensible a la fluorescencia detecta las células una por una, genera por cada célula pulsos eléctricos que se cuentan y ordenan por tamaño, y muestra (Somacount 300).

El California Mastitis Test (CMT) es una prueba sencilla y rápida de recuento indirecto de células (Blowey y Edmondson, 1995), que consiste en el agregado a la leche de un reactivo que contiene un detergente (alquilaril sulfonato de sodio) lo que causa la liberación del ADN de las células presentes y este se convierte en combinación con agentes proteicos de la leche

como un gel. A mayor presencia de células se libera una mayor cantidad de ADN, por lo tanto mayor será la formación de gel. Además el reactivo posee un colorante (púrpura de bromocresol), que indica los cambios de pH ocurridos en la leche a raíz de la inflamación (Chaffer y Saran, 2000).

Los resultados obtenidos al realizar la prueba del CMT son valorados en: Negativo(N), Trazas (T), 1, 2 y 3 (Philpot y Nickerson, 1992), según el gel que se forme (cuadro N° 1).

La prueba se realiza de la siguiente manera:

1. Se descartan 2-3 chorros de leche.
2. Se ordeña uno o dos chorros de leche de cada cuarto en cada una de las placas de la paleta.
3. Se inclina la paleta de modo que se deje aproximadamente 2 ml de leche.
4. Se añade a la leche un volumen igual de reactivo.
5. A continuación se mezcla esta solución y se examina en cuanto a la presencia de una reacción de gelificación. Antes de continuar en la vaca siguiente, se debe enjuagar la paleta (Blowey y Edmonton, 1995).

Cuadro N° 1: Correlación entre CMT y Células Somáticas

Grado de CMT	Rango de Células Somáticas
N (Negativo)	0 – 200,000
T (Trazas)	200,000 – 400,000
1	400,000 – 1,200,000
2	1,200,000 – 5,000,000
3	Más de 5,000,000

Fuente: (Mellenberger y Roth, 2000)

4.2. TRATAMIENTO ANTIMICROBIANO

Las mastitis clínicas se tratan en el momento en que aparecen durante la lactancia.

Los antibióticos son drogas que se usan para combatir enfermedades como la mastitis causada por diversos microorganismos. Son administrados a los animales en diferentes formas, siendo las más comunes la intramamaria o la inyección intramuscular (Duarte y Pena, 2008).

Las penicilinas constituyen uno de los grupos de antibióticos de mayor importancia y se siguen sintetizando nuevos derivados del núcleo penicilínico básico. Muchos de ellos ofrecen ventajas peculiares, por tal razón los miembros de este grupo constituyen los fármacos más indicados contra un gran número de enfermedades infecciosas (Bruton y col, 2007).

Las penicilinas tienen por lo regular actividad bactericida contra bacterias susceptibles sobre la síntesis de la pared, por lo que se consideran más eficaces frente a microorganismos en crecimiento activo (Booth y McDonald, 1987).

4.2.1. Mecanismo de Acción

Las penicilinas basan su acción bactericida en la unión del fármaco a las proteínas fijadoras de penicilina (PBP), consiguiendo así la inhibición de las etapas finales de la síntesis del peptidoglucano o mureína de la pared bacteriana.

La pared bacteriana es una cubierta rígida presente en todas las bacterias salvo en los micoplasmas (microorganismos que por este motivo presentan una resistencia intrínseca a los betalactámicos). Esta pared protege a la bacteria de su alta presión osmótica, por lo que su destrucción conduce a la lisis de la bacteria (Plumb, 2006).

4.2.2. Clasificación

Los β lactámicos (penicilina, amoxicilina, cloxacilina, etc.) son el grupo de agentes antimicrobianos más utilizado en Uruguay. Con porcentajes de resistencia de *S. aureus* a la penicilina menor al 20 %, utilizaríamos esta droga en primera línea, por su bajo costo, baja toxicidad y espectro específico, siendo una importante herramienta para reducir el desarrollo de resistencia. Y de acuerdo a los resultados obtenidos en Uruguay (40% de resistencia) la penicilina tiene que ser prescrita luego de realizar el estudio de susceptibilidad correspondiente. (Giannechini y col, 2005).

Las penicilinas se clasifican en:

1) Penicilinas naturales: G y V. La Penicilina G es una penicilina natural obtenida a partir de los cultivos del *Penicillium chrysogenum*. Poseen actividad contra las espiroquetas y cocos aeróbicos Gram positivos, pero no contra las cepas que elaboran penicilinasas (como el *S. aureus* que es penicilina resistente porque se ha adaptado para producir la enzima betalactamasa) (Blowey y Edmonton, 1995). Poseen actividad contra algunos bacilos Gram positivos aeróbicos y anaeróbicos como *Bacillus anthracis*, *Clostridium*, *Fusobacterium* y *Actinomyces*.

Las penicilinas naturales son inactivas frente a la mayoría de los bacilos Gram negativos aeróbicos y anaeróbicos (Plumb, 2006).

En línea general si la bacteria es susceptible a una penicilina natural, se prefiere la penicilina G o V para tratar esa infección (Plumb, 2006).

2) Penicilinas resistentes a penicilinasas: cloxacilina, dicloxacilina, oxacilina, nafcilina y meticilina. Tienen un espectro de actividad más estrecho que las penicilinas naturales. Su eficiencia antimicrobiana se orienta directamente contra las cepas productoras de penicilinasas de cocos Gram positivos en particular *Staphylococcus sp.*, y estas drogas en ocasiones son denominadas penicilinas antiestafilococicas. Las penicilinas resistentes a las penicilinasas son inactivas contra *Rickettsia*, micobacterias, hongos, *Mycoplasma* y virus (Plumb, 2006).

3) Penicilinas de espectro ampliado:

a) De espectro medio:

Aminopenicilinas: ampicilina, amoxicilina, bacampicilina.

b) De amplio espectro:

Carboxipenicilinas: carbenicilina, ticarcilina.

Ureidopenicilinas: piperacilina, aslocilina, meslocilina (Plumb, 2006).

4) Penicilinas potenciadas: amoxicilina / clavulanato de potasio, ampicilina / sulbactam y ticarcilina / clavulanato de potasio (Plumb, 2006).

4.2.3. Susceptibilidad de los principales agentes causales de mastitis en nuestro país a los antibióticos

Del Baglivi y col. (1976) evaluaron la resistencia de *S. aureus* y del grupo de los *Streptococcus* aislados en el estudio hecho en la cuenca sur de nuestro país. Siendo para el primero de 47 % con respecto a penicilina, 6 % a tetraciclinas y 2.4 % a eritromicina, mientras que para *Streptococcus* todas las cepas fueron susceptibles a penicilina.

Herrera (1982) encontró una susceptibilidad del 78 % de las cepas de *S. aureus* aisladas en la cuenca lechera de Tacuarembó. Mientras que Bouman y col. (1999) en un estudio hecho en cepas de *S. aureus* y SCN aislados de muestras de leche en la rutina del laboratorio ubicado en Colonia durante 4 años, determinó para penicilina, cloxacilina, nafcillin, rifamixina y tetraciclina: 58 %, 16 %, 5 %, 6 %, y 29 % de resistencia para *S. aureus* y 75 %, 42 %, 17 %, 12 %, 26 % para SCN, respectivamente.

Estudios realizados por Giannechini y col, (2001) en 29 tambos de la cuenca litoral oeste de Uruguay en los que se caracteriza la resistencia a los agentes antimicrobianos de los diferentes patógenos aislados. De las 336 cepas aisladas de *S. aureus*, 160 (47.6 %) fueron resistentes a la penicilina, mientras 156 (46.4 %) fueron productoras de beta-lactamasa. Con respecto a las 41 cepas de SCN, 10 (27 %) presentaron resistencia a la penicilina y 9 (22.5 %) fueron también productoras de beta-lactamasa. Todas las cepas de *Streptococcus* fueron sensibles a penicilina, mientras que 3 cepas de Enterococos (7 %) en 43 fueron resistentes a penicilina. Oxacilina fue incluida en el estudio para detectar cepas meticilina resistente de *S. aureus* y SCN. Resistencia a la oxacilina indica resistencia a todos los otros agentes antimicrobianos β -lactámicos, en dichos estudios no se encontraron cepas de *S. aureus* y SCN resistentes a oxacilina.

Del Baglivi y col. (1976) en la cuenca lechera sur de Uruguay obtuvo resultados similares a los de Giannechini y col, (2001) comparando la proporción de resistencia de *S. aureus* (47%) y reportaron situación similares con respecto a la susceptibilidad de los *Streptococcus* en Uruguay. La comparación entre estos resultados obtenidos en Uruguay demostró que la situación general no ha cambiado en 25 años en relación con la resistencia a penicilina de *S. aureus* aislado de mastitis bovina.

De un total de 92 cepas de *S. aureus* aislados de casos clínicos de mastitis bovina de la cuenca lechera tradicional de Uruguay se analizó su susceptibilidad ante varios agentes antimicrobianos: 63 (68.5%), 36 (39.1%), 36 (39.1%), 8 (8.6%), 6 (6,5%), 3 (3.3%) y 5 (5.4%) cepas fueron resistente a estreptomina, penicilina, ampicilina, amoxicilina más ácido clavulánico, tetraciclina, eritromicina y oxacilina, respectivamente. De estos, 34 cepas (36.9%) eran productoras de β -lactamasa. (Giannechini y col, 2005).

4.3. TIEMPO DE RETIRADA DE ANTIBIÓTICO EN LECHE



Tiempo de espera, suspensión o retirada es el intervalo de tiempo necesario para que el residuo potencialmente tóxico alcance la concentración inocua exigida (Jackson, 1980). También se refiere al tiempo que se debe esperar para destinar la leche al consumo humano o animal, desde el momento en que se suministró el último tratamiento a la vaca en producción, con el objeto de que no existan residuos de dicho medicamento en el alimento (tolerancia 0), o bien, que dichos residuos se encuentren en proporción inferior al límite máximo admitido (LMR), para dicho medicamento y alimento (concentración legal o inocua) (Prüssing, 2002).

Los tiempos de suspensión varían para cada preparación farmacéutica y también pueden variar igualmente en las distintas especies. Dependiendo del medicamento, de la forma y ruta de administración, el tiempo de suspensión oscila entre una hora y varios días o semanas (Booth y McDonald, 1987).

4.3.1. Efectos en la Salud Pública

El tiempo de espera de antibiótico en leche no se establece para salvaguardar la salud del animal, sino que es necesario para minimizar o prevenir las dosis no permitidas de residuos medicamentosos en los productos de consumo humano (Booth y McDonald, 1987).

La presencia de residuos de antibióticos en la leche es un problema que aqueja a toda la industria lechera debido a que cantidades mínimas de antibióticos en la leche o la carne representan un problema de salud pública que no debe ser aceptado, además de ser ilegal. Se ha determinado que pequeñas cantidades de antibióticos en la leche, cantidades mínimas como 0.003 UI (unidades internacionales) de penicilina/ ml, pueden afectar a una persona que sea alérgica a dicho antibiótico con problemas como ardor en la piel, comezón, asma y shock anafiláctico (Duarte y Pena, 2008).

Además del problema de las reacciones alérgicas, los antibióticos presentes en la leche pueden provocar los siguientes efectos en el consumidor: alteración de la flora intestinal, estimulación de bacterias antibiótico-resistentes, desarrollo de microorganismos patógenos, reducción de la síntesis de vitaminas (Magariños, 2000).

El problema de la resistencia de los microorganismos a los antibióticos puede reducir o eliminar por completo su acción y uso en el tratamiento de enfermedades (Duarte y Pena, 2008).

Desde el punto de vista de la salud pública, el establecer límites máximos permisibles en cuanto a contenido de antibióticos en la leche resulta muy difícil y el uso de un límite inferior sólo debe considerarse como solución transitoria (Magariños, 2000).

En la actualidad no se conocen informes sobre intoxicaciones provocadas por antibióticos de uso común ingeridos a través de la leche y se explica porque sus concentraciones resultan ser muy bajas como para provocar un efecto tóxico, (con la excepción del cloranfenicol). No obstante a lo anterior, subsiste la duda de si el consumo de antibióticos por el hombre, a través de alimentos contaminados, puede alcanzar niveles que determinen una toxicidad de tipo crónico, motivo más que suficiente para prohibir la presencia de éstos en los alimentos (Magariños, 2000).

4.3.2. Problemas Tecnológicos

La producción de productos fermentados es la más afectada en la industria cuando en la leche recibida están presentes residuos de antibióticos, provocando grandes pérdidas en calidad y por ende, económicas. Por ejemplo, las bacterias empleadas en la fabricación de yogurt, *Lactobacillus bulgaricus* y *Str. termophilus* resultan ser unas de las más sensibles a los antibióticos. Las bacterias, por efecto de los antibióticos, presentan cambios morfológicos y pueden darse situaciones en que los cultivos iniciadores sean reemplazados por microorganismos indeseables, provocando la inutilización del producto o que se convierta en peligroso para su consumo (Magariños, 2000).

Los principales efectos provocados por la presencia de antibióticos en los procesos industriales de queso y productos fermentados son: la demora en la acidificación y coagulación, coagulación deficiente, disminución de la retención de agua, desarrollo de microorganismos indeseables, alteración de las características normales del producto como por ejemplo, cuerpo débil, textura blanda, sabor amargo (excesiva acción del cuajo), consistencia arenosa (yogurt), interferencia en la formación de aroma en mantequilla fermentada (Magariños, 2000).

Por otra parte, aún persiste la creencia errónea de que los tratamientos térmicos a que se somete la leche destruyen las sustancias inhibitoras y en forma particular, los antibióticos. Sin embargo, un informe de 1967 de la Federación Internacional de la Lechería señala que la penicilina pierde solamente un 8% de su actividad luego de la pasteurización. Un tratamiento térmico más exigente (90° C por 30 minutos), destruye el 20% de la actividad de la penicilina y la esterilización un 50% (Magariños, 2000).

4.3.3. Repercusiones en los productores

Dado que un tratamiento intramamario puede inutilizar más de 100.000 litros de leche, las industrias han aplicado sanciones a aquellos productores que remitan leche a planta con presencia de residuos de antibióticos (Fabre y col, 2006).

En los Estados Unidos a cada camión de leche se le hacen pruebas sobre la presencia de antibióticos antes de que se descargue el tanque. Si se confirma que el camión da positivo a la presencia de antibióticos, se hacen pruebas a las muestras recogidas de cada una de las granjas para determinar cual contaminó la leche. Toda la carga del camión contaminado se desecha y el granjero responsable es multado. Una granja que viole repetidamente los estándares de residuos de antibióticos recibirá la prohibición de vender leche (Ruegg, 2001).

Las medidas mas comunes aplicadas por CONAPROLE son: la primera vez que esto ocurra (año corrido) no se le pagará la leche del día, en caso de reincidencia no se le paga la leche del día y se le descuenta 5% de la remesa (al cerrar el mes), en la tercera vez no se le paga la leche del día y se le descuenta 10% de la remesa, por cuarta vez no se le paga la leche del día y se le descuenta 15% de la remesa.

4.4. REGLAMENTACIÓN RESPECTO A LA PRESENCIA DE ANTIMICROBIANOS EN ALIMENTOS

Para asegurar la inocuidad de los alimentos, se debe trabajar de manera continua en todos los eslabones de la cadena, de la finca al consumidor, para prevenir los riesgos que puedan afectar la seguridad alimentaria y disminuir las enfermedades transmitidas por alimentos.

La seguridad alimentaria y la calidad no pueden ser separadas.

Las prácticas que incrementan la seguridad alimentaria lo hacen a través de una mejora de la salud animal, por lo tanto disminuyen el riesgo de residuos de medicamentos (Parra y col, 2003).

Con este fin se creó en los años sesenta un marco normativo internacional llamado Codex Alimentarius. Esta es la entidad que se ocupa de la ejecución del programa conjunto entre la FAO y la OMS sobre normas alimentarias y que tiene como fin proteger la salud de los consumidores y asegurar normas equitativas en el comercio de alimentos. Incluye disposiciones referentes a la higiene, residuos, contaminantes, aditivos y promueve prácticas para minimizar los riesgos potenciales sanitarios y ambientales, ligados a los plaguicidas. Adicionalmente abarca el ciclo total de estas sustancias, desde su elaboración, reglamentación, producción, gestión, empaquetado y etiquetado, hasta su distribución, aplicación, uso, control y eliminación (Parra y col, 2003).

Países de gran desarrollo lechero han establecido legislaciones sanitarias gubernamentales, que regulan y norman el uso de antibióticos, controlando los niveles máximos permitidos o también denominados *niveles de tolerancia* en los alimentos de origen animal; que varían de un país a otro, pero siempre dentro de los márgenes recomendados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Booth y Harding, 1986) o la Food and Drug Administration de los Estados Unidos (FDA) (San Martín y Moraga, 1996).

Así por ejemplo el Milk Marketing Board de Inglaterra y Gales, a partir del año 1965, dicta normas sobre el manejo de vacas lactantes con estas drogas (Booth, 1986). La FDA, en la misma década, dictó normas para controlar la presencia de antimicrobianos en alimentos de origen animal, estableciendo sanciones para quienes contravengan estas disposiciones. En la actualidad este organismo controla la calidad de la leche a través del PMO (Pasteurized Milk Ordinance) (San Martín y Moraga, 1996).

Una de las últimas disposiciones de la FDA está dirigida al etiquetado de los productos farmacéuticos, estableciendo que debe incluirse en él, el tiempo de eliminación o también denominado “período de resguardo” de las drogas en la leche. Debe indicarse además las condiciones de almacenamiento de las drogas a nivel predial, señalando que los productos farmacéuticos utilizados en vacas lactantes deben ser separados de aquellos destinados a vacas no lactantes (San Martín y Moraga, 1996).

En Uruguay la autoridad competente para el control de residuos de medicamentos veterinarios y contaminantes en alimentos de origen animal es el MGAP a través del Programa Nacional de Residuos Biológicos (PNRB). Este programa es creado por el Poder Ejecutivo (360/003 del 04/09/03). Es dirigido y administrado por un comité directivo cuyo presidente es el señor director de los Servicios Ganaderos. Está integrado por los directores de: DIA, DSA, DILAVE, DICOSE, gestionado por una coordinación ejecutiva del programa (Departamento técnico de la DIA). En caso de ser necesario y acorde a los temas tratados, integrarían además la DGSA, MSP y MVOTMA (MGAP, 2003).

4.4.1. Método de detección de inhibidores en leche

Todas estas legislaciones pasan por tener técnicas estandarizadas para la detección de residuos de antibióticos en leche, carne y huevos.

Diversos métodos han sido empleados con el fin de detectar “residuos” de antimicrobianos en leche, y su aplicación depende básicamente de los recursos económicos a nivel estatal y privado. Los métodos de mayor sensibilidad corresponden a técnicas fisicoquímicas como por ejemplo la cromatografía de alta resolución (HPLC) (McEwen y col., 1992), métodos inmunológicos como el radioinmunoensayo (Keukens y col, 1992) y uno de los más modernos, el Charm II (Cullors, 1992 a). El empleo de estos métodos, debido fundamentalmente a sus elevados costos, se limita sólo a instituciones supervisoras a nivel gubernamental.

Existen además los métodos microbiológicos, que pueden ser cualitativos y cuantitativos, y se basan en la capacidad de difusión del antibiótico o sulfa en un medio de cultivo que contiene determinada cepa bacteriana. Éstos tienen la ventaja de poseer una fácil implementación, ser de bajos costos, y otorgar una adecuada confiabilidad, razón por la cual siguen siendo aún métodos de elección en análisis de rutina (Booth y Harding, 1986; Cullors y col, 1992 b). Así por ejemplo, Commonwealth of Pennsylvania (USA) los utiliza como métodos oficiales para detectar “residuos” de antimicrobianos en leche (Sischo y Burns, 1993) (San Martín y Moraga, 1996).

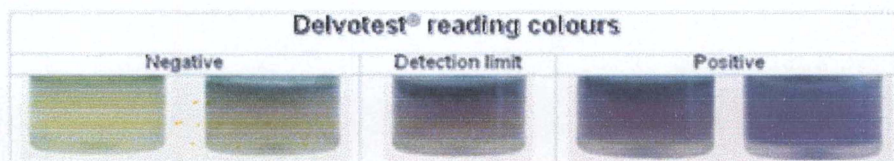
El Delvotest® SP - NT es una prueba de difusión estándar para detección de residuos de sustancias antibacterianas (tales como antibióticos y sulfonamidas) en leche. La prueba consiste de ampollas, conteniendo un medio sólido, agar, sembrado de un número estandarizado de esporas del *Bacillus stearothermophilus* var. *Calidolactis*, junto con nutrientes requeridos para el crecimiento. Este microorganismo ha sido elegido por su alta sensibilidad a la mayoría de los antibióticos, especialmente a las penicilinas y otros compuestos beta-lactámicos (Delvotest® a y b).

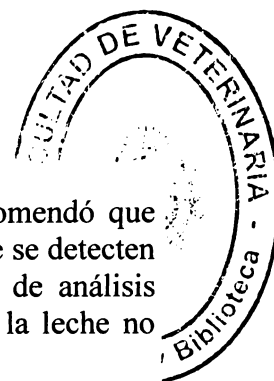
El medio de cultivo presenta coloración púrpura debido al indicador de pH, púrpura de bromocresol. Al momento de realizar la prueba, se añade 0.1 ml de la muestra problema la cual se lleva a incubar a 64° C durante 2 hs y 15 minutos (Delvotest® a y b).

Las esporas germinarán al añadirse las sustancias nutritivas seleccionadas y al aumentar la temperatura a 64° C, una vez germinadas se multiplicarán formando ácido. Una vez producido suficiente ácido, el color del indicador cambiará del púrpura al amarillo (Delvotest® a y b).

Si la muestra de leche contiene una concentración suficientemente elevada de una sustancia inhibidora como un antibiótico, ésta al difundirse en el medio de cultivo impedirá el proceso de multiplicación y la producción de ácido. En tal caso el color de la prueba no cambiará al amarillo; permanecerá púrpura cuando la concentración del inhibidor se encuentre por encima del límite de detección de la prueba para ese inhibidor y tendrá un color intermedio entre el púrpura y el amarillo cuando la concentración del inhibidor sea aproximada al límite de detección (Delvotest® a y b).

Figura 1





4.4.2. Límites máximos residuales (LMR)

El comité Mixto FAO/OMS (1969) de Expertos en Aditivos Alimentarios recomendó que “cuando se emplee penicilina deberá hacerse de manera que no dejen residuos que se detecten en los alimentos destinados al consumo humano”. Si se utilizan los métodos de análisis recomendados por ese comité, ello supondrá que el contenido de penicilina de la leche no excederá de 0,006 ppm.

Cuadro N° 2. Límites Máximos Residuales (LMR) en leche, establecido por, Codex Alimentarius, Unión Europea (UE), Estados Unidos (EUA), Legislación Brasileña, Código Alimentario Argentino, comparado con límites detectables por Delvotest. En µg/Kg. (ppb).

Antibióticos	Codex (*)	UE (*)(**)	EUA (*)	Brasil (*)	Código alimentario Argentino (***)	Delvotest® SP (****)
Penicilina G	4	4	5	4	4	1-2
Cloxacilina		30	10		30	20
Dicloxacilina		30			30	10
Oxacilina		30			30	10
Nafcilina		30				5-8
Ampicilina		4	10	4	4	4
Amoxicilina		4	10	4	4	2-3
Cefapirina		60				4-6
Cefalonium		20				10-20
Cefalexina		100				60-100
Cefacetil		125				20-40
Cefoperazona		50				60-100
Ceftiofur	100	10	50	100		25-50

Fuente: (*) Gebara (2006). Fuente adaptado de Brasil (1999): Pedersen e Suhren (2000): Official Standars- Codex Alimentarius (2006).

(**) Residuos de sustancias antimicrobianas en la leche.

(***) Capitulo XVII Alimentos de regimen o dieteticos .

(****) Delvotest® SP-NT (b).

4.4.3. Propuestas generales para la inspección de los residuos

Para mantener de la forma más completa y permanente que sea posible los productos lácteos libres de contaminación con antibióticos deberán tomarse las siguientes medidas:

- El público no deberá tener acceso a los antibióticos veterinarios, cuya distribución (por veterinarios u otra persona) deberá vigilarse.
Incluso en los casos en que el ganadero deba continuar por sí mismo el tratamiento, deberá disponer sólo de las cantidades estrictamente necesarias para cada caso concreto.
- Los fabricantes de antibióticos deberán indicar claramente en los envases el tiempo durante el cual el producto seguirá siendo excretado en la leche desde el último día de la administración.
- Deberá prohibirse la distribución de leche, después del último tratamiento con antibióticos, por un tiempo suficiente para garantizar la ausencia de residuos.

- Deberá establecer un programa regular de inspección, junto con sanciones para quienes infrinjan sus disposiciones.
- Deberán idearse métodos rápidos y precisos para detectar los antibióticos en la leche, así como un sistema de marcados, como el coloreado de los antibióticos de uso veterinario.
- Deberán utilizarse al máximo los buenos resultados obtenidos tratando la mastitis durante el periodo entre lactancias (o “seco”). Además de ser eficaz, este tratamiento impide la excreción de antibiótico en leche. (Comité Mixto FAO/OMS, 1969).

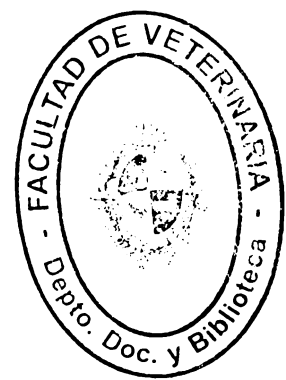
4.5. NATURALEZA DE LOS ANTIBIÓTICOS USADOS

Originalmente se suponía que la cinética del fármaco dentro de la ubre, se daba porque el producto (excipiente + antibiótico), se disolvía en la leche presente en la ubre. Esto permitía que se dispersara a lo largo de los conductos y al reabsorberse dicha leche el producto quedaba impregnado en las paredes de los conductos galactóforos, de esta forma podía ejercer su efecto terapéutico. Actualmente se sabe que todos los productos intramamarios, independientemente del antibiótico y del excipiente usado, son insolubles en la leche. Una de las cualidades que se busca de un tubo intramamario, independientemente del antibiótico presente, es que tenga una excelente difusión dentro de la ubre, es decir, a través de los conductos galactóforos, y que logre llegar hasta los acinos glandulares. Existen seis aspectos importantes a considerar en un antibiótico de aplicación intramamaria que influyen en la biodisponibilidad del mismo:

- a) Grado de disociación.
 - b) pH del fármaco.
 - c) Grado de Ionización.
 - d) Liposolubilidad.
 - e) Unión a las proteínas de la leche.
 - f) Tamaño de la partícula.
- a) Grado de disociación: Se entiende como disociación a la capacidad de un antibiótico de separarse de su excipiente, ya que como se mencionó, este lo hace insoluble en la leche. Un antibiótico que se disocia de su excipiente tiene mayor probabilidad de que sea biodisponible, aún cuando la disociación en sí, no garantice la difusión del mismo (García, 2004).
- b) pH del fármaco: Los antibióticos tienen un pH neutro, con ligera tendencia a la acidez ó alcalinidad (García, 2004).
El medio interno de la ubre, en condiciones de salud, tiende a tener un medio ácido débil, por lo que bajo estas circunstancias, se requiere de un antibiótico neutro o con un pH álcali débil, para que exista atracción entre el medio interno de la ubre y el antibiótico usado. En condiciones de inflamación (infecciosa o mecánica, aguda o crónica), el medio interno se vuelve ligeramente alcalino, por lo que, bajo estas circunstancias, se requiere un antibiótico ácido débil, para que exista atracción entre éste y el medio interno (García, 2004).
- c) Ionización de los fármacos: Se entiende como ionización; la capacidad de los fármacos ácidos o alcalinos, cuando están en solución, de separarse en iones positivos o negativos. Los fármacos ácidos liberan H⁺ y los fármacos alcalinos liberan OH⁻. Durante los estados de inflamación, la leche es ligeramente alcalina, por lo que presenta iones OH⁻. Bajo estas condiciones se requiere un antibiótico ácido débil,

porque entre los iones H^+ de antibióticos ácido débil y los iones OH^- de la leche enferma, existe atracción electrostática. Durante los estados de salud de la ubre, la leche es ligeramente ácida, por lo que presenta iones H^+ . Bajo estas condiciones se requiere un antibiótico álcali débil, porque entre los iones H^+ de antibióticos ácidos débil y los iones H^+ de la leche sana, no existe atracción electrostática (García, 2004).

- d) **Liposolubilidad:** El interior de las paredes de los conductos galactóforos, tiene una consistencia grasosa, debido a que la leche deja una película formada por ácidos grasos sobre éstas. Los antibióticos no se disuelven en el agua de la leche, viajan dentro de la ubre “resbalando” sobre los ácidos grasos de la leche, presentes en las paredes de los conductos galactóforos. Por esta razón mientras más liposoluble sea, mayor será su grado de difusión (García, 2004).
- e) **Unión a las proteínas de la leche:** Tanto en la leche como en la sangre, la parte activa de un antibiótico es la fracción libre; es decir la fracción que no se une a las proteínas. Un antibiótico con baja unión a proteínas de la leche, es un antibiótico que tiene mayor disponibilidad y esta unión está determinada en parte por el grado de ionización y el pH del antibiótico (García, 2004).
- f) **Tamaño de la partícula:** Los antibióticos micronizados tienen características que los hacen especiales. Son altamente hidrosolubles, lo que permite que se absorban rápidamente del sitio de aplicación y pasen al torrente sanguíneo. Esto es muy importante cuando se aplican por vía parenteral y se requieren niveles terapéuticos en sangre en forma rápida, para el control de casos infecciosos agudos. La membrana celular tiene la propiedad de ser hidrofílica y lipófila, por lo que, los productos liposolubles difunden con cierta dificultad, pero los fármacos hidrosolubles difunden rápidamente. Por esta razón, un antibiótico micronizado aplicado por vía parenteral, se absorbe rápidamente al torrente sanguíneo. La farmacocinética de un antibiótico aplicado por vía parenteral, es diferente a la de un antibiótico aplicado por vía intramamaria. La aplicación de un tubo intramamario busca la difusión del producto a lo largo de los conductos galactóforos, no la absorción al torrente sanguíneo, por lo que el uso de antibióticos micronizados, puede resultar irrelevante cuando se aplican por esta vía, incluso podría resultar contraproducente, si estos se absorben al torrente sanguíneo, ya que difícilmente alcanzarían su sitio de acción o bien, no alcanzarían la concentración necesaria. La difusión de un antibiótico en la ubre depende de su liposolubilidad no de su hidrosolubilidad (García, 2004).



4.6. EXCIPIENTE

4.6.1. Definición

Del lat. *excipiens*, *-entis*, part. act. de *excipĕre*, sacar, recibir.

1. m. *Med.* Sustancia inerte que se mezcla con los medicamentos para darles consistencia, forma, sabor u otras cualidades que faciliten su dosificación y uso (Real Academia Española).

Cualquier sustancia más o menos inerte añadida a un fármaco para darle una consistencia o forma adecuada, un vehículo (Blood y Studert, 1994).

La promesa de acción de un medicamento depende tanto del ingrediente activo como de los excipientes usados.

4.6.2. Funciones

Las funciones de los excipientes son:

- Determinar la forma farmacéutica.
- Permitir la correcta acción del ingrediente activo.

Para que un excipiente sea viable debe cumplir con ciertas características como:

- Ser compatibles con los ingredientes activos.
- Compatibilizar activos incompatibles.
- Ser compatibles con el envase.
- Deben estabilizar la formulación.
- Deben minimizar reacciones locales.

Dado el rol de los excipientes, queda claro que un medicamento A y un medicamento B con iguales ingredientes activos, no necesariamente actúan de igual forma dado que pueden tener formulaciones distintas (Gennaro, 2003).

4.6.3. Productos de aplicación intramamaria

Varios aceites de origen animal o vegetal son usados como base en productos de aplicación intramamaria. Varias bases de liberación lenta consisten en combinación de aceites y sales metálicas como el monoestearato de aluminio (Pyörälä, 1987).

El efecto del antibiótico en la infección y la respuesta inflamatoria de la ubre ha recibido mucha atención. La compatibilidad de los tejidos en los medicamentos para tratar la mastitis es un importante factor. Un requerimiento importante en una preparación para la mastitis es que éste cause la mínima irritación en el tejido de la ubre. Las autoridades del Registro de Drogas usualmente demandan información sobre la compatibilidad de los tejidos por medio de ensayos. Métodos clínicos e histológicos y métodos de detección indirecta del grado de irritación, como el recuento de células somáticas, han sido usadas para determinar la compatibilidad, o no, del tejido (Pyörälä, 1987).

Existen muy pocos estudios de la influencia de los excipientes en los parámetros de inflamación. Encontramos un solo estudio realizado por Pyörälä en 1987 que describimos a continuación.

En el estudio los vehículos usados fueron

- Aceite de soja (SO)
- Aceite de maní (PO)
- Monoesterato de aluminio 3%, ácido esteárico 0.04% y 96.6% de aceite mineral (AM).

Los resultados obtenidos por Pyörälä fueron que:

Ninguno de los cuartos tratados con los vehículos mostró signos clínicos de irritación. La infusión con sales tampoco mostró reacción inflamatoria. (Pyörälä, 1987).

Después de la administración intramamaria de los vehículos algunos cambios en los indicadores de inflamación fueron evidentes en todos los grupos: el RCS mostró un leve aumento en la mayoría de los cuartos tratados con aceites. El aceite de soja causó un aumento del recuento en todos los cuartos en los que fue aplicado, y este aumento perduró una semana más luego de la última aplicación. La respuesta causada por los otros vehículos fue más suave. (Pyörälä, 1987). Este estudio demostró que la mayoría de los vehículos investigados causó una leve reacción celular en la ubre.

5. HIPÓTESIS

1. Los tiempos de espera de antibiótico en leche son afectados por los excipientes.
2. Los excipientes producen inflamación en la glándula mamaria.

6. OBJETIVOS

1. Determinar los tiempos de espera en leche de antibióticos de aplicación intramamarios para diferentes formulaciones de excipientes.
2. Determinar el efecto de los excipientes sobre la salud de la ubre a través del recuento celular por vaca y por cuarto mamario.

7. MATERIALES Y MÉTODOS.

7.1. LOCALIZACIÓN DEL ESTUDIO

El estudio se realizó en el tambo del Campo Experimental N° 2 de la Facultad de Veterinaria – UDELAR; Ruta 1, Km. 42, Departamento de San José.

7.2. MATERIALES

- Se utilizaron 40 vacas lecheras, raza Holando y cruce Holando-Jersey (con recuento de células somáticas menor o igual a 200 mil células por mililitro de leche en los tres meses previos al ensayo) en lactación con producciones entre nueve y veinticinco litros diarios.
- Alcohol, algodón, toallas de papel, para desinfección y secado de pezones previo a la aplicación de pomos.
- Paleta y Reactivo para realizar prueba de California Mastitis Test (CMT).
- Medidor de Leche: Tru-Test Ltd. ® New Zeland.
- Tubos plásticos de 10 ml para recolección de muestras con conservantes (bronopol), para recuento de células somáticas por vaca y por cuarto mamario.
- Frascos de vidrio estériles de 10 ml, sin ninguna sustancia para Delvotest®.
- Pomos de aplicación intramamaria, todos formulados con (Penicilina G 300.000 UI, Cloxacilina 200 mg, Excipiente).

Excipientes bases:

Parafina: Es una mezcla purificada de hidrocarburos sólidos obtenidos del petróleo (Gennaro, 2003).

Descripción: Masa incolora o blanca más o menos traslúcida, con estructura cristalina, ligeramente grasosa al tacto: inodora e insípida, congela de 47° a 65° C (Gennaro, 2003).

Solubilidad: completamente soluble en cloroformo, éter, aceites volátiles o la mayoría de los aceites fijos calientes pocos solubles en alcohol absoluto, insoluble en agua o alcohol.

Usos: para aumentar la consistencia de algunos ungüentos (Gennaro, 2003).

Alcohol cetoestearílico:

Preparación: por hidrogenación catalítica del ácido palmitico o saponificación del espermaceti, que contiene palmitato de cetilo (Gennaro, 2003).

Descripción: copos, gránulos, cubos o moldes untuosos, blancos, ligero olor característico y un sabor suave, ligero; funde entre 45° C y 50° C, no menos del 90% destila entre 316° C y 336° C (Gennaro, 2003).

Solubilidad: Insoluble en agua; soluble en alcohol, cloroformo, éter o aceites vegetales.

Usos: Similares a los del alcohol estearílico. También imparte una textura suave a la piel y se usa ampliamente en cremas cosméticas y lociones (Gennaro, 2003).

Los excipientes mencionados anteriormente fueron utilizados solos o en combinación.

Los excipientes utilizados en cada ensayo fueron:

- N° 1 (14/8/06): *Parafina líquida y sólida más aceite vegetal Csp 5 gr.*
- N° 2 (3/10/06): *Parafina líquida y alcohol cetoestearílico más emulgente no iónico al 2%.*
- N° 3 (10/2/07): *Parafina líquida y alcohol cetoestearílico, mas emulgente no iónico al 1%.*
- N° 4 (11/05/07): *Parafina líquida y sólida, mas emulgente no iónico al 0.5%.*
- N° 5 (17/12/07): *Parafina líquida y sólida Csp 3 gr.*

7.3. LIMITACIONES METODOLÓGICAS.

1. Debido a la escasez de material de consulta por los pocos ensayos sobre el tema realizado se debió elaborar una metodología innovadora de acuerdo a los objetivos propuestos.

2. Dado que el descarte de leche produce pérdidas económicas importantes no se pudo disponer en todos los ensayos de la cantidad de animales idealmente requeridos.

7.4. METODOLOGÍA

Se realizaron 5 ensayos según la metodología estipulada en el protocolo de National Mastitis Council (NMC, 1996); donde se utilizó siempre la misma fórmula de antibiótico con variación de los excipientes. Los pomos antimastíticos fueron formulados por el Laboratorio Santa Elena.

Este trabajo fue un ensayo de laboratorio, en el que se realizó uno de los pasos para la formulación de un pomo de aplicación intramamario con la finalidad de verificar si estos son aptos o no, para que el laboratorio continúe con el proceso de elaboración del producto.

7.4.1. Selección de animales

Previo a cada ensayo se procedió a seleccionar los animales según lo estipulado en el NMC.

- Rango de producción entre 9 y 25 litros.
- Animales sanos (con recuento de células somáticas menor o igual a 200.000 cél/ml en los tres meses previos al ensayo).

Para realizar esta selección se midió la producción individual y se tomaron muestras por cuarto en los tres meses previos al comienzo del ensayo una vez al mes y estas muestras se enviaron en tubos de plástico de 10 ml identificados con etiqueta detallando el número de la vaca, número de cuarto mamario y fecha de extracción; que se enviaron para el análisis de recuento de células somáticas (RCS).

El análisis se realizó en el Laboratorio CO.LA.VE.CO (Cooperativa Laboratorio Veterinario de Colonia) por el método de fluoro-opto-electrónico-cell-counting (Somacount 300 Bentley Instrument Inc, Chaska, MN, USA).

7.4.2. Ensayos

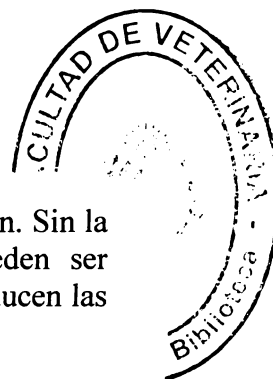
La metodología utilizada en todos los ensayos fue la misma.

Los ordeños se realizaron cada 12 horas, y la aplicación de pomos antimastíticos se hizo durante cuatro ordeños consecutivos. A partir de la última aplicación se determinaron los tiempos de espera del antibiótico en la leche.

Antes de la aplicación de los pomos intramamarios en las vacas seleccionadas, se realizó el CMT prueba indirecta de recuento celular.

Dicha prueba se realizó nuevamente en los ordeños siguientes al primer resultado negativo de antibiótico en leche. En los mismos momentos que se realizó CMT (antes de aplicar los pomos intramamarios y después del último resultado negativo al antibiótico) se tomaron muestras para RCS por cuarto.

En todos los ordeños luego de doce horas de colocado el último pomo se tomaron muestras por vaca para detección de antibiótico en leche por medio del Delvotest® SP-NT, las que se enviaron diariamente al laboratorio CO.LA.VE.CO.



7.4.3. Procedimiento para la aplicación de pomos intramamarios

Los pezones se deben limpiar y desinfectar cuidadosamente antes de la administración. Sin la preparación apropiada, los organismos presentes en el extremo del pezón pueden ser introducidos en la ubre resultando en una infección severa, especialmente si se introducen las bacterias Gram negativas.

El procedimiento a seguir fue:

1. Lavar y secar los pezones con toallas de papel descartable por pezón.
2. Desinfectar individualmente cada extremo de los pezones, limpiando con una torunda de algodón empapada en alcohol al 70%. Preparar primero los pezones de la ubre más alejados a la posición del operador, siguiendo con los más cercanos al mismo.
3. Se realiza la administración de los pomos en orden inverso, es decir primero los pezones de la ubre más cercanos, siguiendo con los pezones lejanos. Insertar la cánula del pomo en el extremo del pezón y vaciar todo el contenido. No permitir que la cánula esté en contacto con agentes contaminantes antes de la administración.
4. Masajear suavemente los pezones desde distal a proximal, para dispersar el producto.
5. Sumergir los pezones en un producto germicida eficaz (sellador) después de la administración del pomo.
6. Identificar las vacas tratadas.

7.4.4. ENSAYO N° 1

- Inicio: 14/8/06.
- N° de vacas: 16 (8 vacas de tratamiento y 8 vacas control), correctamente identificadas.
- Excipientes a base de: Parafina líquida y sólida (de uso farmacológico) más aceite vegetal.

7.4.5. ENSAYO N° 2

- Inicio: 03/10/06
- N° vacas: 8 (4 vacas de tratamiento y 4 vacas control), correctamente identificadas.
- Excipientes: Parafina líquida y alcohol cetosteárico más emulgente no iónico al 2%.

7.4.6. ENSAYO N° 3

- Inicio: 10/02/07
- N° de vacas: 4, (2 vacas de tratamiento y 2 vacas control), correctamente identificadas.
- Excipientes: Parafina líquida y alcohol cetosteárico; emulgente no iónico al 1%

7.4.7. ENSAYO N° 4

- Inicio: 11/05/07
- N° de vacas: 8 (4 vacas de tratamiento y 4 vacas control), correctamente identificadas.
- Excipientes: mezcla de parafina líquida y sólida. emulgente no iónico al 0,5%.

7.4.8. ENSAYO N° 5

- Inicio: 17/12/07 PM
- N° de vacas: 4, (2 vacas de tratamiento y 2 vacas control), correctamente identificadas.
- Excipientes: Mezcla de parafina líquida y sólida Csp 3 g.

7.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Con los resultados obtenidos en cada uno de los 5 ensayos se realizó un análisis descriptivo del tiempo de espera de antibiótico en leche.

Se realizó un análisis estadístico del promedio de litros de leche producidos y el desvío estándar, partiendo de estos para determinar las pérdidas generadas en Dólares Americanos por el descarte de leche por día en una vaca, por día en cada ensayo y por días en el total de cada ensayo.

Con la finalidad de determinar indirectamente a través del RCS si los excipientes provocan irritación se utilizó la prueba estadística t de Student para muestras dependientes e independientes (Steel y Torrie, 1988). Dependientes cuando la comparación se realiza en los mismos animales al comienzo del ensayo y al finalizar el mismo.

De esta manera, los requisitos que deben satisfacerse son los mismos, excepto la independencia de las muestras; es decir, en esta prueba estadística se exige dependencia entre ambas, en las que hay dos momentos espaciados en el tiempo: el primer momento se da antes de la aplicación de los pomos de antibiótico en los cuartos mamarios y el segundo momento se da después del primer resultado negativo a antibiótico en leche. Con ello se da a entender que en el primer período, las observaciones servirán de control o testigo, para conocer los cambios que se susciten después de aplicar una variable experimental.

Con la prueba t se comparan las medias y las desviaciones estándar de grupo de datos y se determina si entre esos parámetros las diferencias son estadísticamente significativas o si sólo son diferencias aleatorias.

Dentro de cada ensayo el análisis estadístico que se aplicó fue el siguiente:

- I. Comparamos en el grupo de animales tratados los RCS del primer ordeño previo a la aplicación de los pomos (“primer ordeño”) con el ordeño luego del primer resultado negativo de antibiótico en leche (“último ordeño”), a través de la prueba de t 1 (utilizamos esta prueba debido a que estamos comparando variables numéricas, con distribución normal y grupos dependientes, ya que se analizan los mismos animales inmediatamente antes de la aplicación de los pomos y luego del primer resultado negativo a antibiótico en leche).
- II. El grupo control se analizó de igual forma y utilizando el mismo análisis estadístico que en el grupo de animales tratados (punto I).
- III. Se realizó la comparación entre resultados de RCS del “primer ordeño” del grupo tratamiento y del grupo control, como si fueran un solo grupo, con el RCS del “último ordeño” del grupo tratamiento y control, también como si fuera un solo grupo, a través de la prueba de t 3 (utilizamos esta prueba debido a que estamos comparando variables numéricas, con distribución normal y grupos independientes).
- IV. Por último se procedió a comparar los resultados de RCS del “último ordeño” del grupo tratamiento con los resultados de RCS del “último ordeño” del grupo control, a través de la prueba de t 3 (utilizamos esta prueba debido a que estamos comparando variables numéricas, con distribución normal y grupos independientes).

8. RESULTADOS

Cuadro N° 3: Tiempo de espera de antibiótico en leche por ensayo.

N° de Ensayos	Tiempo de ATB en leche (horas)
1	192
2	24
3	48
4	84
5	384

Cuadro N° 4: Referencias económicas utilizadas para calcular las pérdidas producidas por ensayo.

Fecha	26/11/09
Precio del dólar en \$	20.5
Lts. De leche en \$	5.11
Lts. De leche en U\$\$	0.25

Fuente: DIEA (2008 b)

Cuadro N° 5: Promedio y Desvío de litros / vaca del total de ensayos.

Promedio lts. por día	18.7
Desvío est. en lts. por día	2.8

Cuadro N° 6: Estimación en Dólares de las Pérdidas de Leche por Ensayo.

Ensayos	Días ATB Leche	N° vacas	Pérdidas en U\$\$/vaca/día	Pérdidas Totales U\$\$/día	Pérdidas en U\$\$/vaca/ensayo
1	8	8	4.7	37.4	299
2	1	4	4.7	18.7	18.7
3	2	2	4.7	9.3	18.7
4	3.5	4	4.7	18.7	65.4
5	16	2	4.7	9.3	149.5

8.1. Ensayo N° 1 (Inicio 14/08/06)

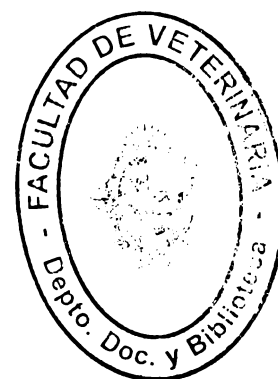
El tiempo de espera fue de 192 horas (8 días).

Siguiendo el criterio establecido en el numeral 7.4. se obtuvieron los siguientes resultados:

- I. En la prueba t 1 realizada al grupo tratado, estadísticamente no se demostró diferencias significativas (0,243); tomando como diferencia significativa valores $\leq 0,05$ (Ver Cuadro N° 7).
- II. En la prueba t 1 realizada al grupo control, estadísticamente no se demostró diferencias significativas (0,053). tomando como diferencia significativa valores $\leq 0,05$ (Ver Cuadro N° 8).
- III. En la prueba t 3 realizada comparando “primer ordeño” y “último ordeño” de los animales tratados y control, como si fueran un solo grupo, estadísticamente no se demostró diferencias significativas (0,400); se toma como diferencia significativa valores $\leq 0,05$ (Ver Cuadro N° 9).
- IV. En la prueba t 3 realizada comparando los “últimos ordeños” de los grupos tratamiento y control, estadísticamente no se demostró diferencias significativas (0,212) (Ver Cuadro N° 10).

Cuadro N° 7: RCS por cuarto utilizados para realizar el Test de t 1 en el grupo tratamiento.

N° VACA	CUARTOS	RCS (mil cél/ml)	
		PRIMER ORDEÑO	ULTIMO ORDEÑO
127	CAI	53	37
	CAD	32	45
	CPI	4	167
	CPD	89	123
128	CAI	45	156
	CAD	23	34
	CPI	78	27
	CPD	7	56
202	CAI	123	98
	CAD	167	653
	CPI	23	64
	CPD	67	1.274
325	CAI	52	74
	CAD	178	53
	CPI	189	4
	CPD	183	9
320	CAI	27	113
	CAD	72	78
	CPI	34	39
	CPD	84	52
118	CAI	9	14
	CAD	12	28
	CPI	42	268
	CPD	34	49
314	CAI	67	34
	CAD	78	18
	CPI	123	19
	CPD	174	27
5	CAI	18	117
	CAD	62	23
	CPI	26	23
	CPD	35	77



Test de t 1 0.243 No significativo

Cuadro N° 8: RCS por cuarto utilizados para realizar el Test de t 1 en el grupo control.

RCS (mil cél/ml)			
N° VACA	CUARTOS	PRIMER ORDEÑO	ULTIMO ORDEÑO
116	CAI	13	67
	CAD	14	25
	CPI	36	11
	CPD	22	4
935	CAI	13	74
	CAD	12	34
	CPI	4	29
	CPD	10	244
902	CAI	7	217
	CAD	14	34
	CPI	17	27
	CPD	18	222
223	CAI	156	45
	CAD	27	43
	CPI	98	52
	CPD	130	45
36	CAI	142	92
	CAD	168	112
	CPI	142	110
	CPD	164	100
106	CAI	193	34
	CAD	23	45
	CPI	173	21
	CPD	134	22
318	CAI	96	33
	CAD	45	5
	CPI	143	10
	CPD	156	29
2	CAI	145	52
	CAD	67	66
	CPI	31	78
	CPD	28	83

Test de t 1 0.499 No significativo

Cuadro N° 9: RCS por cuarto utilizados para realizar el Test de t 3 para comparar primer y último ordeño del grupo tratamiento y control.

RCS (mil cél/ml)			
N° VACA	CUARTOS	PRIMER ORDEÑO	ULTIMO ORDEÑO
127	CAI	53	37
	CAD	32	45
	CPI	4	167
	CPD	89	123
128	CAI	45	156
	CAD	23	34
	CPI	78	27
	CPD	7	56
202	CAI	123	98
	CAD	167	653
	CPI	23	64
	CPD	67	1.274
325	CAI	52	74
	CAD	178	53
	CPI	189	4
	CPD	183	9
320	CAI	27	113
	CAD	72	78
	CPI	34	39
	CPD	84	52
118	CAI	9	14
	CAD	12	28
	CPI	42	268
	CPD	34	49
314	CAI	67	34
	CAD	78	18
	CPI	123	19
	CPD	174	27
5	CAI	18	117
	CAD	62	23
	CPI	26	23
	CPD	35	77
116	CAI	13	67
	CAD	14	25
	CPI	36	11
	CPD	22	4
935	CAI	13	74
	CAD	12	34
	CPI	4	29
	CPD	10	244
902	CAI	7	217
	CAD	14	34
	CPI	17	27
	CPD	18	222
223	CAI	156	45
	CAD	27	43
	CPI	98	52
	CPD	130	45
36	CAI	142	92
	CAD	168	112
	CPI	142	110
	CPD	164	100
106	CAI	193	34
	CAD	23	45
	CPI	173	21
	CPD	134	22
318	CAI	96	33
	CAD	45	5
	CPI	143	10
	CPD	156	29
2	CAI	145	52
	CAD	67	66
	CPI	31	78
	CPD	28	83

Test de t 3 0.400 No significativo

Cuadro N° 10: RCS por cuarto utilizados para realizar el Test de t 3 para comparar el último ordeño del grupo tratamiento y control.

N° VACA	CUARTOS	RCS (mil cél/ml)	N° VACA	RCS (mil cél/ml)
		ULTIMO ORDEÑO TRATAM		ULTIMO ORDEÑO CONTROL
127	CAI	37	116	67
	CAD	45		25
	CPI	167		11
	CPD	123		4
128	CAI	156	935	74
	CAD	34		34
	CPI	27		29
	CPD	56		244
202	CAI	98	902	217
	CAD	653		34
	CPI	64		27
	CPD	1.274		222
325	CAI	74	223	45
	CAD	53		43
	CPI	4		52
	CPD	9		45
320	CAI	113	36	92
	CAD	78		112
	CPI	39		110
	CPD	52		100
118	CAI	14	106	34
	CAD	28		45
	CPI	268		21
	CPD	49		22
314	CAI	34	318	33
	CAD	18		5
	CPI	19		10
	CPD	27		29
5	CAI	117	2	52
	CAD	23		66
	CPI	23		78
	CPD	77		83

Test de t 3 0.212 No significativo

8.2. Ensayo N° 2 Inicio: 03/10/06.

El tiempo de espera fue de 24 horas (1 día).

- I. En la prueba t 1 realizada al grupo tratado, estadísticamente no se demostró diferencias significativas (0,076) (Ver Cuadro N° 11).
- II. En la prueba t 1 realizada al grupo control, estadísticamente no se demostró diferencias significativas (0,053) (Ver Cuadro N° 12).
- III. En la prueba t 3 realizada comparando “primer ordeño” y “último ordeño” de los animales tratados y control, como si fueran un solo grupo, estadísticamente no se demostró diferencias significativas (0,432) (Ver Cuadro N° 13).
- IV. En la prueba t 3 realizada comparando los “últimos ordeños” de los grupos tratamiento y control, estadísticamente no se demostró diferencias significativas (0,920) (Ver Cuadro N° 14).

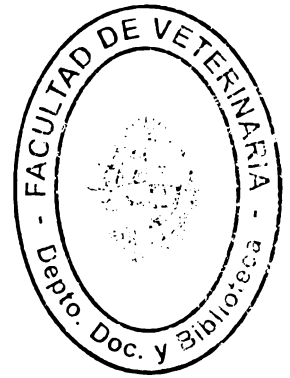
Cuadro N° 11: RCS por cuarto utilizados para realizar el Test de t 1 en el grupo tratamiento.

N° VACA	CUARTOS	RCS(mil cél/ml)	
		PRIMER ORDEÑO	ULTIMO ORDEÑO
128	CAI	23	56
	CAD	96	93
	CPI	114	111
	CPD	26	22
314	CAI	54	74
	CAD	9	124
	CPI	24	51
	CPD	5	67
320	CAI	45	53
	CAD	15	55
	CPI	8	36
	CPD	21	22
5	CAI	100	11
	CAD	123	7
	CPI	52	9
	CPD	17	34

Test de t 1 0.676374576 No significativo

Cuadro N° 12: RCS por cuarto utilizados para realizar el Test de t 1 en el grupo control.

N° VACA	CUARTOS	RCS(mil cél/ml)	
		PRIMER ORDEÑO	ULTIMO ORDEÑO
12	CAI	54	83
	CAD	85	56
	CPI	33	177
	CPD	55	22
106	CAI	24	9
	CAD	45	76
	CPI	24	44
	CPD	3	66
303	CAI	11	12
	CAD	87	90
	CPI	8	118
	CPD	21	22
319	CAI	111	11
	CAD	65	7
	CPI	55	45
	CPD	17	11



Test de t 1 0.53588798 No significativo

Cuadro N° 13: RCS por cuarto utilizados para realizar el Test de t 3 para comparar el primer y último ordeño del grupo tratamiento y control.

N° VACA	CUARTOS	RCS (mil cél/ml)	
		PRIMER ORDEÑO	ULTIMO ORDEÑO
128	CAI	23	56
	CAD	96	93
	CPI	114	111
	CPD	26	22
314	CAI	54	74
	CAD	9	124
	CPI	24	51
	CPD	5	67
320	CAI	45	53
	CAD	15	55
	CPI	8	36
	CPD	21	22
5	CAI	100	11
	CAD	123	7
	CPI	52	9
	CPD	17	34
12	CAI	54	83
	CAD	85	56
	CPI	33	177
	CPD	55	22
106	CAI	24	9
	CAD	45	76
	CPI	24	44
	CPD	3	66
303	CAI	11	12
	CAD	87	90
	CPI	8	118
	CPD	21	22
319	CAI	111	11
	CAD	65	7
	CPI	55	45
	CPD	17	11

Test de t 3 0.43262202 No significativo

Cuadro N° 14: RCS por cuarto utilizados para realizar el Test de t 3 para comparar el último ordeño del grupo tratamiento y control.

N° VACA	CUARTOS	RCS (mil cél/ml)	N° VACA	RCS (mil cél/ml)
		ULTIMO ORDEÑO TRATAM		ULTIMO ORDEÑO CONTROL
128	CAI	56	12	83
	CAD	93		56
	CPI	111		177
	CPD	22		22
314	CAI	74	106	9
	CAD	124		76
	CPI	51		44
	CPD	67		66
320	CAI	53	303	12
	CAD	55		90
	CPI	36		118
	CPD	22		22
5	CAI	11	319	11
	CAD	7		7
	CPI	9		45
	CPD	34		11

Test de t 3 0.92026257 No significativo

8.3. Ensayo N° 3 Inicio: 10/02/07

El tiempo de espera fue de 48 horas (2 días).

- I. En la prueba t 1 realizada al grupo tratado, estadísticamente no se demostró diferencias significativas (0,43) (Ver Cuadro N° 15).
- II. En la prueba t 1 realizada al grupo control, estadísticamente se demostró diferencias significativas (0,02) (Ver Cuadro N° 16).
- III. En la prueba t 3 realizada comparando “primer ordeño” y “último ordeño” de los animales tratados y control, como si fueran un solo grupo, estadísticamente se demostró diferencias significativas (0,004) (Ver Cuadro N° 17).
- IV. En la prueba t 3 realizada comparando los “últimos ordeños” de los grupos tratamiento y control, estadísticamente no se demostró diferencias significativas (0,659) (Ver Cuadro N° 18).

Cuadro N° 15: RCS por cuarto utilizados para realizar el Test de t 1 en el grupo tratamiento.

N° VACA	CUARTOS	RCS (mil cél/ml)	
		PRIMER ORDEÑO	ULTIMO ORDEÑO
320	CAI	43	78
	CAD	178	30
	CPI	156	124
	CPD	56	156
406	CAI	30	123
	CAD	22	110
	CPI	8	56
	CPD	56	67

Test de t 1 0.433568433 No significativo

Cuadro N° 16: RCS por cuarto utilizados para realizar el Test de t 1 en el grupo control.

N° VACA	CUARTOS	RCS (mil cél/ml)	
		PRIMER ORDEÑO	ULTIMO ORDEÑO
313	CAI	76	78
	CAD	39	52
	CPI	44	112
	CPD	56	173
409	CAI	30	88
	CAD	9	42
	CPI	34	56
	CPD	56	67

Test de t 1 0.02084469 Significativo

Cuadro N° 17: RCS por cuarto utilizados para realizar el Test de t 3 para comparar primer y último ordeño del grupo tratamiento y control.

N° VACA	CUARTOS	RCS (mil cél/ml)	
		PRIMER ORDEÑO	ULTIMO ORDEÑO
320	CAI	43	78
	CAD	178	30
	CPI	156	124
	CPD	56	156
406	CAI	30	123
	CAD	22	110
	CPI	8	56
	CPD	56	67
313	CAI	76	78
	CAD	39	52
	CPI	44	112
	CPD	56	173
409	CAI	30	88
	CAD	9	42
	CPI	34	56
	CPD	56	67

Test de t 3 0.0469576 Significativo

Cuadro N° 18: RCS por cuarto utilizados para realizar el Test de t 3 para comparar el último ordeño del grupo tratamiento y control.

N° VACA	CUARTOS	RCS (mil cél/ml)	
		ULTIMO ORDEÑO TRATAM	ULTIMO ORDEÑO CONTROL
320	CAI	78	78
	CAD	30	52
	CPI	124	112
	CPD	156	173
406	CAI	123	88
	CAD	110	42
	CPI	56	56
	CPD	67	67

Test de t 3 0.6597017 No significativo

8.4. Ensayo N° 4 11/05/07 PM

El tiempo de espera fue de 84 horas (3.5 días).

- I. En la prueba t 1 realizada al grupo tratado estadísticamente no se demostró diferencias significativas (0,098) (Ver Cuadro N° 19).
- II. En la prueba t 1 realizada al grupo control estadísticamente no se demostró diferencias significativas (0,065) (Ver Cuadro N° 17).
- III. En la prueba t 3 realizada comparando “primer ordeño” y “último ordeño” de los animales tratados y control, como si fueran un solo grupo, estadísticamente se demostró diferencias significativas (0,029); se toma como diferencia significativa valores $\leq 0,05$ (Ver Cuadro N° 20).
- IV. En la prueba t 3 realizada comparando los “últimos ordeños” de los grupos tratamiento y control, estadísticamente no se demostró diferencias significativas (0,308) (Ver Cuadro N° 21).

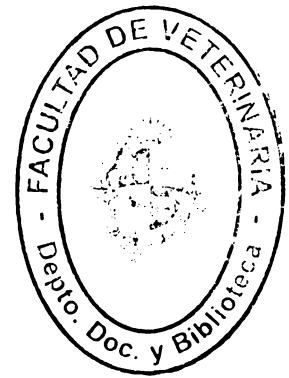
Cuadro N° 19: RCS por cuarto utilizados para realizar el Test de t 1 en el grupo tratamiento.

N° VACA	CUARTOS	RCS (mil cél/ml)	
		PRIMER ORDEÑO	ULTIMO ORDEÑO
305	CAI	6	3.040
	CAD	4	18
	CPI	5	61
	CPD	6	26
405	CAI	4	2.350
	CAD	4	994
	CPI	4	35
	CPD	5	30
429	CAI	4	13
	CAD	15	14
	CPI	4	36
	CPD	4	22
430	CAI	100	13
	CAD	7	12
	CPI	14	52
	CPD	17	55

Test de t 1 0.098236525 No significativo

Cuadro N° 20: RCS por cuarto utilizados para realizar el Test de t 1 en el grupo control.

N° VACA	CUARTOS	RCS(mil cél/ml)	
		PRIMER ORDEÑO	ULTIMO ORDEÑO
28	CAI	6	44
	CAD	4	23
	CPI	5	19
	CPD	6	26
118	CAI	4	70
	CAD	4	32
	CPI	4	174
	CPD	5	154
210	CAI	34	13
	CAD	15	119
	CPI	4	163
	CPD	9	22
169	CAI	42	13
	CAD	149	12
	CPI	22	889
	CPD	56	923



Test de t 1	0.0650	No significativo
-------------	--------	------------------

Cuadro N° 21: RCS por cuarto utilizados para realizar el Test de t 3 para comparar primer y último ordeño del grupo tratamiento y control.

N° VACA	CUARTOS	RCS (mil cél/ml)	
		PRIMER ORDEÑO	ULTIMO ORDEÑO
305	CAI	6	3.040
	CAD	4	18
	CPI	5	61
	CPD	6	26
405	CAI	4	2.350
	CAD	4	994
	CPI	4	35
	CPD	5	30
429	CAI	4	13
	CAD	15	14
	CPI	4	36
	CPD	4	22
430	CAI	100	13
	CAD	7	12
	CPI	14	52
	CPD	17	55
28	CAI	6	44
	CAD	4	23
	CPI	5	19
	CPD	6	26
118	CAI	4	70
	CAD	4	32
	CPI	4	174
	CPD	5	154
210	CAI	34	13
	CAD	15	119
	CPI	4	163
	CPD	9	22
169	CAI	42	13
	CAD	149	12
	CPI	22	889
	CPD	56	923

Test de t 3 0.02960735 Significativo

Cuadro N° 22: RCS por cuarto utilizados para realizar el Test de t 3 para comparar el último ordeño del grupo tratamiento y control.

N° VACA	CUARTOS	RCS (mil cél/ml)	N° VACA	RCS (mil cél/ml)
		ULTIMO ORDEÑO TRATAM		ULTIMO ORDEÑO CONTROL
305	CAI	3.040	28	44
	CAD	18		23
	CPI	61		19
	CPD	26		26
405	CAI	2.350	118	70
	CAD	994		32
	CPI	35		174
	CPD	30		154
429	CAI	13	210	13
	CAD	14		119
	CPI	36		163
	CPD	22		22
430	CAI	13	169	13
	CAD	12		12
	CPI	52		889
	CPD	55		923

Test de t 3 0.30886427 No significativo

8.5. Ensayo N° 5 Inicio: 17/12/07

El tiempo de espera fue de 384 horas (16 días).

- I. En la prueba t 1 realizada al grupo tratado estadísticamente no se demostró diferencias significativas (0,107) (Ver Cuadro N° 23).
- II. En la prueba t 1 realizada al grupo control estadísticamente no se demostró diferencias significativas (0,279) (Ver Cuadro N° 24).
- III. En la prueba t 3 realizada comparando “primer ordeño” y “último ordeño” de los animales tratados y control, como si fueran un solo grupo, estadísticamente no se demostró diferencias significativas (0,057) (Ver Cuadro N° 25).
- IV. En la prueba t 3 realizada comparando los “últimos ordeños” de los grupos tratamiento y control, estadísticamente no se demostró diferencias significativas (0,438) (Ver Cuadro N° 26).

Cuadro N° 23: RCS por cuarto utilizados para realizar el Test de t 1 en el grupo tratamiento.

N° VACA	CUARTOS	RCS (mil cél/ml)	
		PRIMER ORDEÑO	ULTIMO ORDEÑO
10	CAI	66	234
	CAD	23	562
	CPI	156	277
	CPD	56	287
433	CAI	41	123
	CAD	84	75
	CPI	55	9
	CPD	131	67

Test de t 1 0.107943642 No significativo

Cuadro N° 24: RCS por cuarto utilizados para realizar el Test de t 1 en el grupo control.

N° VACA	CUARTOS	RCS (mil cél/ml)	
		PRIMER ORDEÑO	ULTIMO ORDEÑO
2	CAI	43	53
	CAD	178	543
	CPI	156	43
	CPD	56	R
202	CAI	30	6
	CAD	22	23
	CPI	8	10
	CPD	56	110

Test de t 1 0.48866937 No significativo

Cuadro N° 25: RCS por cuarto utilizados para realizar el Test de t 3 para comparar primer y último ordeño del grupo tratamiento y control.

N° VACA	CUARTOS	RCS (mil cél/ml)	
		PRIMER ORDEÑO	ULTIMO ORDEÑO
10	CAI	66	234
	CAD	23	562
	CPI	156	277
	CPD	56	287
433	CAI	41	123
	CAD	84	75
	CPI	55	9
	CPD	131	67
2	CAI	43	53
	CAD	178	543
	CPI	156	43
	CPD	56	265
202	CAI	30	6
	CAD	22	23
	CPI	8	10
	CPD	56	110

Test de t 3 0.05755645 No significativo

Cuadro N° 26: RCS por cuarto utilizados para realizar el Test de t 3 para comparar el último ordeño del grupo tratamiento y control.

N° VACA	CUARTOS	RCS (mil cél/ml)	N° VACA	RCS (mil cél/ml)
		ULTIMO ORDEÑO TRATAM		ULTIMO ORDEÑO CONTROL
10	CAI	234	2	53
	CAD	562		543
	CPI	277		43
	CPD	287		265
433	CAI	123	202	6
	CAD	75		23
	CPI	9		10
	CPD	67		110

Test de t 3 0.43887845 No significativo

9. DISCUSIÓN

Se seleccionaron animales con un rango de producción entre 9-25 lts por día ya que una producción lechera baja (menos de 9 Kg. de leche por día) prolonga el período de excreción o reduce el ritmo de eliminación del antibiótico en la leche (Mercer y col, 1970 b, citado por Booth y McDonald, 1987).

En este trabajo los tiempos de espera variaron entre 1 y 16 días. Según diversos autores la penicilina es retenida en la leche y en los tejidos durante 24 horas cuando se usa en vehículo acuoso, 48 horas cuando se utiliza emulsión aceite-agua, y 72 horas con un vehículo aceite vegetal y mineral. (Peoples y Piper, 1960, citado por Booth y McDonald, 1987).

Sin embargo a pesar de haber usado excipientes en base a parafina y alcohol cetosteárico obtuvimos tiempos de espera mayores a 72 hs. en tres de los cinco ensayos.

Por otro lado, las penicilinas son antibióticos que basan su efecto en el tiempo que permanecen en la glándula mamaria. Señalándose que deben permanecer por un período no menor a 96 hs (Errecalde, 2004).

Por lo tanto tiempos de espera menores a cuatro días para este grupo de antibióticos pondrían en duda su eficacia.

Por otro lado, tiempos mayores a cuatro días aumentarían las pérdidas ocasionadas por el descarte de leche como se muestra en los anexos cuadro N° 6 donde se hace una estimación de las pérdidas producidas en cada uno de los ensayos de acuerdo a los tiempos de espera determinados.

Para determinar el efecto irritante de los excipientes sobre la salud de la ubre en este trabajo se utilizó el recuento celular por vaca y por cuarto al igual que en otros trabajos Pyörälä, 1987 describe el efecto irritante de algunos vehículos utilizados en el tratamiento de la mastitis. El aceite mineral, aceite de soja, aceite de cacahuete, una combinación de monoestearato de aluminio, ácido esteárico y el aceite mineral, así como la solución salina isotónica fueron infundidos intracisternal en las vacas durante la mitad de la lactancia. Estos excipientes indujeron un leve aumento en el número de células somáticas (Pyörälä, 1987).

Hay que destacar que los excipientes evaluados por Pyörälä, no coinciden con los utilizados en nuestro estudio. En la mayoría de los ensayos que realizamos en este trabajo no se demostraron diferencias significativas en el RCS medido de forma directa o indirecta (CMT) entre el grupo tratado y control.

Entre los casos que se demostró diferencias significativas se encuentra el ensayo N° 3 donde el resultado que se obtuvo de la prueba T 1 realizada al grupo control al comparar dentro de este el primer con el último ordeño podría deberse a que en el primer ordeño los RCS eran muy bajos comparados con los del último ordeño. Pero no podríamos afirmar que existió irritabilidad ya que al analizar individualmente los RCS ninguno de ellos superó las 200.000 cél/ml.

En el ensayo N° 3 como en el N° 4 al realizar la prueba de T 3 comparando primer ordeño y último ordeño de los animales tratados y control, como si fueran un solo grupo, se demostró diferencias significativas, ello podría atribuirse a factores ajenos al tratamiento que hayan provocado un leve aumento en el RCS tanto en el grupo tratado como control.

El trabajo realizado por Pyörälä es el único trabajo que evalúa irritabilidad de forma independiente porque la mayoría de las investigaciones estudian como los vehículos influyen en la eficacia de los antimicrobianos.

10. CONCLUSIONES

El tiempo de espera se vio influenciado por el tipo de excipiente utilizado.

Del largo período de tiempo de espera encontrado en algunos ensayos (192 hs, 384 hs) se desprende que estos no serían económicamente rentables para el productor por altas pérdidas generadas por el descarte de la leche.

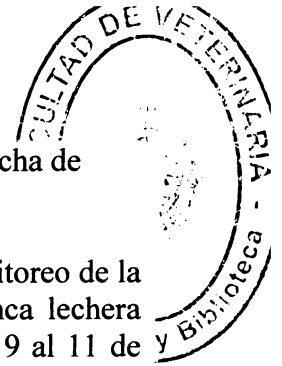
Por otro lado, tiempos de retirada menores a 96 hs para antimastíticos formulados en base a penicilina y cloxacilina plantean dudas sobre su eficacia, que para este tipo de antibióticos depende del tiempo de acción.

Los excipientes utilizados no causaron inflamación en la glándula mamaria, ya que los recuentos celulares antes y después de la administración del pomó, no tuvieron diferencias significativas, así como tampoco se encontraron diferencias significativas entre el grupo tratado y el control.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1) Blood, DC, Studert, V.P (1994). Diccionario de Veterinaria Vol I ed. México. Interamericana McGraw-Hill. 1597 p.
- 2) Blowey, R, Edmonton, P. (1995) Control de la Mastitis en Granjas de Vacunos de Leche. Zaragoza. Acribia. 208 p.
- 3) Booth, N.H, McDonald, L.E. (1987) Farmacología y Terapéutica Veterinaria. Vol II. Zaragoza. ed Acribia, 527 p.
- 4) Booth, J.M., F. Harding, (1986). Testing for antibiotic residues in milk. Vet. Rec. 119:565-569.
- 5) Bouman, M, Irigoyen, D y Bertón, A. (1999): Análisis de los resultados de 427 muestras remitidas para aislamiento de bacterias de mastitis y antibiograma. Jornadas de Salud de la ubre, Nueva Helvecia, Uruguay. p 59-68.
- 6) Bruton, L, Lazo, J, Parker, K (2007). Goodman y Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica, 11^a. ed. México. Mc Graw-Hill Interamericana. 2017 p.
- 7) Capitulo XVII Alimentos de regimen o dieteticos. Disponible en: http://www.alimentosargentinos.gov.ar/programa_calidad/Marco_Regulatorio/CAA/CAPITULOXVII.htm. Fecha de consulta 20/09/2009.
- 8) Chaffer, M, Saran, A. (2000). Mastitis y Calidad de la Leche .Buenos Aires. Inter-Médica, 194 p.
- 9) Comité Mixto FAO/OMS Expertos en Zoonosis (1969). Tercer informe. Roma. FAO-OMS. 159 p.
- 10) Corbellin, C (2002) La mastitis bovina y su impacto sobre la calidad de la leche. III Seminario Internacional Competitividad en Leche. Buenos Aires. Disponible en: <http://www.e-campo.com/?event=news.print&id=B369643F-07D3-4DF6-AE9A43847BCCAC3A&>. Fecha de consulta 06/06/2009.
- 11) Cullors, J.S (1992 a). Test for identifying Antibiotic residues in milk: How well do they work? Vet. Med. 87: 1235-1241.
- 12) Cullors, J.S., A. Van Eenennaam, J. Dellinger, L. Perani, W. Smith, L. Jensen (1992 b). Antibiotic residue assays: Can they be used to test milk from individual cows? Vet. Med. 87: 477-494.
- 13) Del Baglivi, L, Bonilla, M y Laborde, M. (1976). Investigaciones sobre mastitis subclínica en rodeos lecheros del Uruguay. Veterinaria Montevideo. 61:69-77.
- 14) Delvotest® (a). Antibiotic residue testing with Delvotest: safe and simple. Disponible en: http://www.dsm.com/le/en_US/delvotest/html/delvotest_perform.htm. Fecha de consulta 20/09/2009. Fecha de consulta 20/09/2009.

- 15) Delvotest® SP-NT (b). Pruebas de difusión estándar para determinación de sustancias antibacterianas en la leche. Disponible en:
http://www.biotec-ea.com/pdf/equipos/delvotest_sp.pdf. Fecha de consulta 20/09/2009.
- 16) DIEA: Anuario estadístico. Dirección de Estadísticas Agropecuarias. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. Uruguay (2008 a). Disponible en:
http://www.mgap.gub.uy/Diea/Anuario2008/Anuario2008/pages/DIEA-Anuario-2008-cd_051.html Fecha de consulta el 10/08/2009.
- 17) DIEA: Anuario estadístico. Dirección de Estadísticas Agropecuarias. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. Uruguay (2008 b). Disponible en:
<http://www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7,5,56,O,S,0,MNU;E;2;16;10;2;MNU>.
Fecha de consulta 25/11/2009.
- 18) Duarte, E, Pena, G. (2008). Uso de Antibióticos en la Ganadería Lechera. Art. publicado el 3 de enero del 2008 en extensión staff. Disponible en:
[http://www.extension.org/pages/Uso de Antibióticos en la Ganadería Lechera#Se debe respetar los tiempos de desecho de la leche de vacas tratadas con antibi.C3.B3ticos](http://www.extension.org/pages/Uso%20de%20Antibioticos%20en%20la%20Ganaderia%20Lechera#Se%20debe%20respetar%20los%20tiempos%20de%20desecho%20de%20la%20leche%20de%20vacas%20tratadas%20con%20antibi.C3.B3ticos). Fecha de consulta el 10/09/2009.
- 19) Errecalde, J.O (2004) Uso de antibiótico en animales de consumo. Universidad nacional de la Plata. Disponible en: <http://ftp.fao.org/docrep/fao/007/y5468s/y5468s00.pdf>. Fecha de consulta 25/11/2009.
- 20) Fabre J.M, Petit C, Bosquet G (2006). Comprendre et prévenir les risques de résidus d'antibiotiques dans les denrées d'origine animale. Disponible en:
http://www.dsm.com/le/static/delvotest/downloads/GuideDelvotest10Points_Fr.pdf. Fecha de consulta el 20/11/2009.
- 21) Fetrow, J, Stewart, S, Eicker, S, Farnsworth, R y Bey, R: (2000). Mastitis: an economic consideration. 39th Annual Meeting, National Mastitis Council, Inc. Madison, WI 53704, U.S.A. p. 3-47.
- 22) García, D (2004). Terapia del secado en ganado lechero. Disponible en:
www.virbac.com.mx. Fecha de consulta 05/09/2009.
- 23) Gebara, C. (2007). Avaliação da eficiência do testecopan (microplate e single) na detecção de resíduos de antimicrobianos no leite. Dissertação apresentada à UFMG, Mestre em Medicina Veterinária. Belo Horizonte. 59 p.
- 24) Gennaro, A.J. (2003). Excipientes y otros productos para la elaboración farmacéutica. Farmacia Remington . 20^a ed. tomo I. Med Panamer Bs As. 1408 p.
- 25) Giannechini, R, Concha, C, Franklin, A, Rivero, R, Delucci, I, Parietti, I, De Maria, P, Garcia, A.y Moreno Lopez, J. (2001). Ocurrencia y etiología de mastitis clínica y subclínica, y susceptibilidad de los patógenos de la ubre en rodeos lecheros de la cuenca litoral oeste de Uruguay. XXIX Jornadas Uruguayas de Buiatría. Paysandú. p. 44-57.
- 26) Giannechini, R, Parietti, I, y De Maria, P. (2002). Evaluación de pérdidas económicas relacionadas a mastitis para establecimientos lecheros en Uruguay. Jornada de lechería 10 años de actividades del Laboratorio de Calidad de Leche. INIA La Estanzuela de Junio del 2002. Disponible en:



- <http://www.inia.org.uy/publicaciones/documentos/le/ad/2002/informe-1.pdf>. Fecha de consulta 18/09/2009.
- 27) Giannechini, R, Concha, C, Rivero, R, J, Gil y Moreno-Lopez, J. (2005). Monitoreo de la resistencia de *Staphylococcus aureus* aislados en rodeos lecheros de la cuenca lechera tradicional de Uruguay. XXXIII Jornadas Uruguayas de Buiatría. . Paysandú 9 al 11 de junio 2005-Uruguay. p. 205-207.
- 28) Herrera, B:(1982). Etiología de las mastitis subclínicas y estudio de la cuenca lechera de Tacuarembó. III Congreso Nacional de Veterinaria, Montevideo, Uruguay, p. 495-505.
- 29) Hogan, J.S, Smith, K.L, Hoblet, K.H, Schoenberger, P.S, Todhunter, D.A, Hueston, W.D, Pritchard, D.E, Bouman, G.L, Heider, L.E, Brockett, B.L y Conrad, H.R (1989 a). Field survey of clinical mastitis in low somatic cell count herds. *J. Dairy Sci.* 72:1546-1547.
- 30) Hogan, J.S, Smith, K.L, Hoblet, K.H, Schoenberger, P.S, Todhunter, D.A, Hueston, W.D, Pritchard, D.E, Bouman, G.L, Heider, L.E, Brockett, B.L y Conrad, H.R (1989 b). Bacterial counts in bedding materials used on nine commercial dairies. *J. Dairy. Sci.* 72:250-258.
- 31) Hortet P y Seegers H: (1998). Loss in milk yield and related composition change resulting from clinical mastitis in dairy cows. *Prev. Vet. Med.* 37: 1 -20.
- 32) Jackson, B. A. (1980). Safety Assessment of Drug Residues. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 176: 1141-1144.
- 33) Keukens, H.J, Aerts, M.M.L, and Traag, W.A, Nouws, J.F.M, Ruig, W.G, Beek, W.M.J, and Hartog, J.M.P. (1992). Analytical Strategy for the Regulatory Control of Residues of Chloramphenicol in Meat: Preliminary Studies in Milk. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 75: 245-256.
- 34) Mcewen, S.A, Black, W.D, Meek, A.H (1992). Antibiotic residues (bacterial inhibitory substances) in the milk of cows treated under label and extra-label conditions. *Can. Vet. J.* 33: 527-534.
- 35) Magariños, H. (2000) Producción Higiénica de la Leche Cruda. Valdivia. Producción y Servicios Incorporados. 104 p.
- 36) Mellenberger, R, Roth, C. J. (2000). Hoja de Información de la Prueba de Mastitis California (CMT). Michigan. Disponible en:
<http://www.uwex.edu/MilkQuality/PDF/CMT%20spanish.pdf>. Fecha de consulta 26/11/2009.
- 37) Ministerio de Ganadería Agricultura. Dirección General de Servicios Ganaderos. Programa Nacional de Residuos Biológicos en Alimentos de Origen Animal. Uruguay (2003). Disponible en:
<http://www.presidencia.gub.uy/decretos/2003090406.htm>. Fecha de consulta 25/11/2009.
- 38) National Mastitis Council, (1996). Current Concepts of Bovine Mastitis. National Mastitis Council. Disponible en: <http://www.nmconline.org>. Fecha de consulta 04/02/2009.

- 39) Parra, M, Peláez, L, Londoño, J, Pérez, N, Rengifo, G. (2003). Los residuos de medicamentos en la leche Problemática y estrategias para su control. Disponible en: http://www.agronet.gov.co/www/docs_si2/20061024154510_control%20estrategico20residuos%20medicamentos%20en%20la%20leche.pdf. Fecha de consulta 20/09/2009.
- 40) Philpot, WN. (1978). Manejo de la mastitis. Louisiana del Norte. Babson. 72 p.
- 41) Philpot WN, Nickerson SC (1992) Mastitis el contra ataque. Lousinana. Babson Brothers Co. 147p.
- 42) Philpot, WN (1999) Aumento de la rentabilidad mediante el mejoramiento de la calidad de leche y la reducción de la mastitis. Curso de Perfeccionamiento Mejoramiento de la Calidad Higiénica de Leche de Pequeños Productores. Osorno, CL. 6-8 Diciembre (1999). U. Chile, Facultad. Cs. Veterinarias y Pecuarias, UFOCO S.A. p 49-84.
- 43) Plumb, D.C (2006). Manual de Farmacología Veterinaria. 5ª ed. Bs. As Intermedica. 870p.
- 44) Prüssing, P. (2002). Antibióticos. sus periodos de resguardo. Disponible en: <http://www.e-cooprinsem.cl/softagri/Cooprinforma64/Articulo13.htm> - 12k. Fecha de consulta 06/07/2008.
- 45) Pyörälä, S (1987). Effect of some vehicles used in intramammary mastitis preparations on inflammation indicators in milk. J. Vet. Pharm. Ther. 10: 248-253.
- 46) Radostitis OM, Gay CC, Blood, DC, Hinchcliff, KW (2002). Medicina Veterinaria. Tratado de las enfermedades del Ganado vacuno, ovino, porcino, caprino y equino. 9ª. ed. Madrid. Interamericana McGraw-Hill. Vol II, 2215 p.
- 47) Real Academia Española. Diccionario de la Lengua Española. 22ª ed. Disponible en: http://buscon.rae.es/draeI/SrvltGUIBusUsual?TIPO_HTML=2&TIPO_BUS=3&LEMA=Excipiente. Fecha de consulta 20/10/2009.
- 48) Residuos de sustancias antimicrobianas en la leche. Disponible en: <http://dspace.upv.es/manakin/bitstream/handle/10251/1977/tesisUPV2193.pdf?sequence=1>. Fecha de consulta 21/11/2009.
- 49) Ruegg, P.L (2001). Secreción de Leche y Estándares de Calidad. Universidad de Wisconsin, Madison. Disponible en: http://www.uwex.edu/milkquality/PDF/milksecretionandqualitystandards_ppt_sp.pdf. Fecha de consulta 20/11/2009.
- 50) San Martín, N.B, Moraga, R (1996). Evaluación de la técnica microbiológica con Bacillos Subtilis BGA para la identificación de residuos de antimicrobianos en leche bovina, Avances en Ciencias Veterinarias. Disponible en: http://www.avancesveterinaria.uchile.cl/CDA/avan_vet_seccion/0,1422,SCID%253D12729%2526ISID%253D480,00.html. Fecha de consulta: 08/10/2009.
- 51) Sischo, W.M, Burns, B.S. (1993). Field trial of four cowside antibiotic residue screening tests. JA VMA. 202: 1249-1254.

- 52) Smith, KL, Hogan, J.S. (1995). Epidemiology of mastitis. Proceeding of the 3rd International Mastitis Seminar, Tel Aviv, Israel, session 6 pp. 3-10.
- 53) Smith, KL (1996). Standards for somatic cell count in milk: Physiological and Regulatory. Mastitis Newsletter, Newsletter of the Int. Dairy Fed., 21: 7-9.
- 54) Somacount 300. Contador de Células en Leche. Disponible en: http://www.siemsrl.com.ar/somacount_300.html. Fecha de consulta 04/11/2009.
- 55) Steel, R, Torrie, J (1988). Bioestadística principios y procedimientos. 2^a ed. Mexico. McGraw-Hill. 622 p.
- 56) Uruguay XXI. Promoción de Inversiones y Exportaciones. Uruguay País Lechero (2009). Disponible en: <http://www.uruguayxxi.gub.uy/innovaportal/file/188/1/Lacteos%20-%20Uruguay%20XXI.pdf>. Fecha de consulta 21/08/2009.

12. ANEXOS

Cuadro N° 27: Comparación entre CMT y RCS

Cell/ml / GRADOS	NEGATIVO	T	1	2	3	4
≤ 200.000	303					
200.000 - 400.000			8			
400.000 - 1.200.000				3	3	
1.200.000 - 5.000.000						
≥ 500.000						2

Este cuadro muestra la relación entre los resultados del recuento celular con la técnica de CMT realizada durante los ensayos. Del mismo se desprende la alta correlación que existe entre el análisis directo del conteo de células somáticas con el análisis indirecto (California Mastitis Test).