

## **Evaluación de residuos de antimicrobianos por la prueba Delvotest en una cuenca lechera de Antioquia con alto índice de mastitis subclínica** - Evaluation of milk antimicrobial residues using the Delvotest in an area of Antioquia with a high incidence of subclinical mastitis

**Reyes, J.**<sup>1</sup>; **Villar, D.**<sup>3</sup>; **Olivera, M.**<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Grupo de investigación CENTAURO, <sup>2</sup> Grupo de Investigación Biogénesis, <sup>3</sup>Grupo Vericel, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia, AA 1226, Medellín, Colombia. <sup>2</sup> [molivera@quimbaya.udea.edu.co](mailto:molivera@quimbaya.udea.edu.co), [syngamia@gmail.com](mailto:syngamia@gmail.com)

---

### **Resumen**

La valoración de la calidad higiénico-sanitaria de la leche es un aspecto fundamental en los programas de monitoreo y puede ayudar a identificar problemas de sanidad y manejo de medicamentos por parte del productor. Este estudio determinó el recuento de células somáticas (RCS) y la presencia de residuos de antimicrobianos, como parámetros de calidad de la leche, en una cuenca lechera colombiana donde el ordeño es manual en un 80% y el 10% de productores no disponen de tanques de refrigeración. Se recogieron muestras de leche de un total de 112 productores, en días inesperados de cada semana del mes de Julio, 2009. Las pruebas empleadas fueron la de Porta SCC® para el RCS y el DELVOTEST® SP para la detección de residuos de antimicrobianos. Con respecto al RCS no se observaron diferencias significativas entre las 4 semanas muestreadas, con una media ( $\pm$  D.E.) de  $926.300 \pm 724.600$  células/mL (n=434). Sólo el 23% (101/434) de las muestras tenían valores por debajo del umbral aceptable de 400.000 cel/mL, 35% (153/434) de ellas superó la cifra de 1.000.000 cel/mL. El porcentaje de muestras positivas a la presencia de residuos fue del 7.3%, 19.6%, 4,6% y 4,7% para cada semana consecutiva. No se observó asociación significativa entre el número de células somáticas y la presencia de residuos. Estos resultados sugieren la existencia de problemas serios de mastitis subclínica en los hatos, así como de incumplimiento de la norma colombiana, donde se estipula que la leche debe estar libre de residuos de medicamentos antimicrobianos.

**Palabras clave:** *leche, mastitis, recuento de células somáticas, antimicrobianos, sanidad.*

## SUMMARY

Testing for milk quality and safety indexes is an essential aspect of dairy monitoring programs, and can be used to highlight problems of sanitation and poor management practices. In this study we determined the somatic cells counts (SCC) and the presence of antimicrobial residues as indicators of milk quality, in an area of Antioquia where milking is performed manually in 80% of the farms and approximately 10% lack refrigeration tanks. From each of 112 farms studied, one milk sample was collected per week during July of 2009. Samples were analysed the same day of collection using the SCC® test and DELVOTEST® SP. There were no significant differences in SCC between weeks, with an average ( $\pm$  D.E.) of  $926.300 \pm 724.600$  cel/mL (n=434). Only 23% (101/434) samples presented values below the recommended threshold of 400.000cel/mL, and 35% (153/434) of the samples presented counts over 1.000.000 cel/mL. Positive samples to the Delvotest were 7.3%, 19.6%, 4,6% and 4,7% for each one of the four weeks studied. No association was found between the presence of antimicrobial residues and SCC. These data suggest a high incidence subclinical mastitis and a lack of compliance to the current Colombian laws regarding the absence of antibiotics residues in milk.

---

## Introducción

En la actualidad, Colombia está implementando programas de certificación a granjas lecheras en los que la finalidad prioritaria la constituye producir leche segura y de calidad aceptable. Los parámetros de calidad de leche se enmarcan en la regulación del Codex alimentarius que, por una parte reconoce la calidad higiénico-sanitaria en base a la ausencia de microbios y recuento de células somáticas (RCS), y por otro lado define la inocuidad del alimento como la ausencia de contaminantes que puedan afectar la salud humana, ya sean residuos derivados de medicamentos veterinarios o sustancias provenientes del entorno animal (v.g., micotoxinas, insecticidas, metales pesados, etc).

Con respecto a la calidad higiénico-sanitaria de la leche, el RCS es el parámetro más usado ya que no sólo permite conocer el estado de salud de la glándula mamaria sino que además guarda estrecha relación con la composición de la leche (Schallibaum 2001, Santos et al 2003 ). Una<sub>2</sub>

leche con un RCS elevado tiene un alto nivel de enzimas indeseables (v.g., lipasa, plasmina) capaces de degradar proteínas y grasas, lo que puede conferir un sabor desagradable a la leche, además de disminuir su vida comercial y potencial para la producción de lácteos sólidos (v.g., quesos). Por lo general, se acepta que un RCS por encima de 200,000 células mL<sup>-1</sup> a nivel de hato son indicativos de la presencia de mastitis subclínica; no obstante, valores por debajo de 400,000 células mL<sup>-1</sup> se consideran típicos de granjas con buenas prácticas de manejo sin que hagan especial hincapié en el control de la mastitis (García, 2004). Muchas plantas procesadoras rechazan la leche con valores de RCS por encima de 400.000 células mL<sup>-1</sup>, e incluso imponen sanciones económicas (Resolución 012 2007 MADR). Además, se ha demostrado que la producción de leche disminuye cuando aumentan las células somáticas (Bennedsgaard et al. 2003.)

Con respecto a la inocuidad de la leche, en materia de residuos de medicamentos, el Codex Alimentarius especifica exactamente los límites máximos de residuos permisibles ([www.codexalimentarius.net](http://www.codexalimentarius.net)). Para verificar su cumplimiento, la industria lechera y las agencias gubernamentales deben establecer programas de monitoreo de residuos, cuyo objetivo es además de detectar su presencia, señalar que leche no debe consumirse o usarse para elaborar productos destinados al consumo humano.

Actualmente, los residuos más importantes que aparecen en la leche son los producidos por medicamentos antimicrobianos (antibióticos, sulfonamidas, quinolonas) usados en el tratamiento de enfermedades infecciosas, y en especial de la glándula mamaria (Faria *et al.*, 2005). Entre las muchas pruebas que existen para la detección de residuos en leche y carnes, los métodos basados en inhibición microbiana, como la difusión en agar o inhibición de la producción de ácido, han sido durante muchas décadas, y siguen siendo, los más empleados y de referencia oficial (ISO, 1998; Craigmill et al 2004; Pikkemaat, 2009). De todas ellas, el Delvotest, de la que actualmente existen cuatro versiones, ha sido quizás la más empleada a nivel mundial en programas de monitoreo de la industria lechera y es la aprobada para Colombia. La prueba consiste en la inhibición del crecimiento del *Bacillus stearothermophilus* durante 3 horas a 64°C. Como el rango de sustancias que pueden afectar el crecimiento del *B. stearothermophilus* es muy amplio, se trata de una prueba poco específica cuya finalidad es establecer la presencia o ausencia de residuos de antimicrobianos. De hecho, al ser una prueba muy sensible (v.g., detección de pocas partes por billón), un resultado negativo ha sido generalmente considerado como garantía de ausencia de residuos antimicrobianos. Otras ventajas que han facilitado su uso en países como Colombia ha sido su bajo costo, ser de fácil ejecución e3

interpretación, y permitir examinar gran número de muestras de leche cruda en poco tiempo antes de usarse para venta o elaboración de productos lácteos. La principal desventaja del Delvotest y otras pruebas análogas es la de no permitir identificar una sustancia, tampoco cuantificar los niveles a los que se presenta en la leche, así como el riesgo de falsos positivos descritos en algunos estudios (Andrew et al., 1997; Kang et al., 2005).

Este estudio forma parte del establecimiento de programas de monitoreo en una zona poco tecnificada de Antioquia, donde el número de vacas por hatos es bajo y todavía predomina el ordeño manual sobre el mecánico. El objetivo de este trabajo fue determinar dos parámetros de calidad de la leche para así valorar la necesidad de implementar programas de mejora que puedan beneficiar al productor, industria láctea y finalmente el consumidor.

## **Materiales y métodos**

### *Recolección de muestras y análisis.*

Se seleccionó el corregimiento de Aragón, situado en el municipio de Santa Rosa de Osos al norte de Antioquia, donde según los censos de vacunación (FEDEGAN 2008 ) existen 160 productores con un promedio de 30 animales por finca, de los cuales la mayoría (~80%) carece de ordeño mecánico y al menos un 10% no dispone de tanques de refrigeración. Cada semana del mes de Julio de 2009 se realizó un monitoreo, sin previo aviso, de la leche que llegaba al centro de acopio comunitario procedente de cada uno de 112 de los 160 productores censados. Las muestras se recogieron en recipientes estériles y fueron llevadas a refrigeración inmediatamente hasta su posterior análisis ese mismo día. Los métodos de análisis empleados fueron el "Porta SCC Milk Test" (Fullwood Ltd., Shropshire, Reino Unido) para el recuento de células somáticas y el "Delvotest SP" (DSM Food Specialities, Holanda) para la detección de residuos de antimicrobianos.

### *Estadística*

Los datos de RCS se tabularon por granja para cada una de las 4 semanas y se sometieron a un análisis de varianza de muestras repetidas en el tiempo. Para establecer la posible asociación entre la variable "recuento de células somáticas" y variable "presencia de residuos", se asignó cada valor de RCS dentro de uno de cinco rangos cada 200,000 células mL<sup>-1</sup>. Dichos rangos se representaron frente al resultado positivo o negativo de la detección de residuos en una tabla de contingencia de 5x2

a la que se aplicó la prueba de Chi-cuadrado. La selección de rangos por cada 200,000 se hizo arbitrariamente, pero asegurando que el número de muestras por casillero permitiese el número mínimo para realizar la prueba estadística.

## Resultados

Los valores obtenidos para el RCS se muestran en la Tabla 1. No hubo diferencias significativas entre ninguna de las 4 semanas muestreadas ( $P \geq 0.31$ ), todas ellas con medianas por encima de 600,000 células s mL<sup>-1</sup> (Tabla 1). La media ( $\pm$  D.E) del total de muestras analizadas fue de  $926.39 \pm 724.60$  células mL<sup>-1</sup> (n=434, correspondientes a 4 muestras por productor semanalmente). Solo un 23% (101/434) de la muestras tenían valores por debajo del umbral aceptable de 400.000 células mL<sup>-1</sup>, y tan sólo un 11.5% (50/434) estaba por debajo de 200.000 células mL<sup>-1</sup>, que sería el nivel considerado como ideal para hatos prácticamente libres de mastitis subclínica. Hasta un 35% (153/434) de las muestras superaban la cifra de 1.000.000 cel mL<sup>-1</sup>, valores que ya indican una situación de mastitis grave en los hatos.

**Tabla 1.** Valores descriptivos del Recuento de Células Somáticas (RCS) en leche muestreada durante 4 semanas a 112 productores del municipio de Santa Rosa de Osos

Semana	Media $\pm$ D.E. (células/mL) #	Mediana (células/ mL)	Número muestras*	de	Coefficiente de Variación
1	840.900 694.580	$\pm$ 666.000	109		82.6%
2	921.900 762.250	$\pm$ 720.000	112		82.7%
3	993.080 719.893	$\pm$ 760.000	107		72.5%
4	951.726 720.250	$\pm$ 745.000	106		75.7%

# No hubo diferencias significativas entre semanas (ANOVA de medidas repetidas en el tiempo)

\*En algunas semanas no se obtuvieron muestras de todos los productores.

El análisis de chi-cuadrado (Tabla 2) mostró que no existía una relación significativa ( $\chi^2=7.2$ ,  $P=0.12$ ) entre el RCS y el resultado de la prueba de detección de residuos, indicando que ambos parámetros son independientes y por tanto uno no afecta el resultado del otro. Por semanas consecutivas, el porcentaje de muestras positivas a la

presencia de residuos de antimicrobianos fue del 7.3%, 19.6%, 4,6% y 4,7%, respectivamente.

**Tabla 2.** Tabla de contingencia con el número de muestras de leche positivas y negativas a residuos de sustancias antimicrobianas para cada uno de los rangos de recuento de células somáticas (n=434).

Prueba de residuos	RCS (células/mL x10 <sup>3</sup> )					TOTAL
	< 200	200-400	400-600	600-800	>800	
Positiva	9	6	3	4	16	<b>38</b>
Negativa	44	47	66	63	176	<b>396</b>
<b>TOTAL</b>	<b>53</b>	<b>53</b>	<b>69</b>	<b>69</b>	<b>192</b>	<b>434</b>

Chi-cuadrado = 7.2 (P=0.12)

## Discusión

El objetivo de este estudio fue determinar un parámetro de calidad sanitaria y otro de inocuidad de la leche en un municipio de Antioquia donde todavía predomina el ordeño manual sobre el mecánico. Los resultados del recuento de células somáticas mostraron que tan solo un 23% de las muestras tenían valores por debajo del umbral de 400,000 células mL<sup>-1</sup> aceptable por la industria lechera, claramente evidenciado un problema grave de mastitis subclínica en la mayoría de granjas, y que probablemente está disminuyendo la calidad de la leche y además ocasionando pérdidas serias en producción. Aunque sería difícil estimar las pérdidas del productor sin disponer de volumen de leche producido en cada granja, si se asumen las estimaciones generalmente aceptadas de que por cada 100,000 células mL<sup>-1</sup> a partir de 200,000 cel mL<sup>-1</sup> disminuye la producción en un 2.5% (Blowey y Edmondson 1999) y tomando un valor de mediana de 700,000 células mL<sup>-1</sup> (Tabla 1) para cada una de las semanas muestreadas, se podría estimar que en al menos en la mitad de granjas las pérdidas están por encima del 12.5% de la producción que ese mismo hato produciría si estuviese libre de infección mamaria. Otros parámetros de calidad higiénico-sanitario que cobrarían especial importancia, considerando el problema de mastitis vigente y que muchos productores de la zona carecen de almacenamiento en frío, serían los análisis de tipo microbiológicos de la leche, lo cual permitiría evaluar el grado de exposición de la leche a bacterias contagiosas y ambientales.



Con respecto a la detección de residuos de medicamentos antimicrobianos en leche, los resultados ponen de relieve un problema serio de incumplimiento de la normativa vigente en Colombia para poder comercializar la leche (Resolución 012 2007 MADR ). De hecho, en la tercera semana de muestreo hasta un 19% de las muestras dieron positivas a la presencia de sustancias antimicrobianas en leche. Aunque se ha observado que la prueba del Delvotest puede emitir falsos positivos, se ha visto que esto ocurre principalmente en muestras de leche individual (no diluida) procedente de vacas recién paridas o con mastitis (Kang y Kondo 2001, Gibbons-Burgener et al., 2001).

En ambas situaciones, la leche contiene sustancias naturales Antimicrobianas como la lactoferrina, lisozima, anticuerpos, etc., capaces de inhibir el crecimiento del *B. stearothermophilus* y que por tanto hacen que la prueba no sea específica para detectar medicamentos antimicrobianos de uso veterinario en la leche de cuartos individualmente (Elagamy, 2000). Para investigar si existía una posible interacción del RCS con la prueba del Delvotest, se realizó una prueba de chi-cuadrado como se muestra en la Tabla 2. El resultado mostró que ambas variables se comportaban independientes, lo que en principio haría suponer que la prueba de RCS no está interfiriendo en la detección de medicamentos antimicrobianos. A pesar de ello, cuando los resultados son positivos sería recomendable hacer una segunda prueba más específica capaz de identificar el tipo de sustancia inhibitoria y así poder tener certeza absoluta de que la positividad es por la presencia de uno o más medicamentos veterinarios. En un estudio realizado en 1018 granjas francesas se observó que la principal causa de presencia de residuos de antimicrobianos (antibióticos, sulfonamidas, quinolonas, etc.) en leche provenía de tratamientos relacionados con la mastitis, y que, junto a los tratamientos de secado constituían el 88% de las posibles causas de muestras positivas (Fabre et al., 1995). En base a dicho estudio y asumiendo que un alto RCS es indicativo de alta incidencia de mastitis, es muy probable que gran parte de las muestras positivas a residuos en los hatos de Santa Rosa estén directamente relacionadas con tratamientos para mastitis, y que probablemente no se estén respetando los tiempos de abstinencia recomendados para los medicamentos empleados.

Del punto de vista práctico se podrían realizar varias recomendaciones. Por una parte, sería aconsejable implementar programas relacionados con la sanidad de los animales y de los tratamientos que se efectúan en las explotaciones como los descritos por la Federación Internacional Lechera (FIL-FAO, 2004). Entre otras disposiciones, dichos programas deberían incluir medidas de: a) prevención de enfermedades (v.g., aplicación del California Mastitis Test para separar animales enfermos, descarte de<sub>7</sub>

animales con infecciones crónicas y contagiosas, revisión del proceso de ordeño haciendo hincapié en medidas que favorezcan la higiene de la ubre e impidan el contagio por microorganismos ambientales) y b) de cumplimiento de las indicaciones que figuran en la etiqueta de los medicamentos (v.g., respetar tiempos de retiro apropiados según el medicamento empleado). Para lograr este segundo objetivo, sería importante que la industria lechera, que es la encargada de hacer las pruebas de calidad de la leche cruda antes de su elaboración, participase en la formación de los ganaderos en cuanto a buenas prácticas de manipulación de la leche y ensayos preliminares para la detección de residuos de medicamentos, con el fin de determinar si la leche está libre de residuos antes de ser comercializada.

En conclusión y considerando que tan sólo se midieron dos parámetros de calidad de leche, este estudio sugiere que existe un problema en la calidad sanitaria de la leche en una zona del municipio de Santa Rosa de Osos. Habría que comenzar revisando las técnicas de producción de la leche e identificar aquellas prácticas que probablemente estén contribuyendo a una mala salud de la glándula mamaria así como a la presencia de residuos de antimicrobianos en leche. Se deberían establecer puntos críticos de control en el proceso de producción de la leche y que estos a su vez estuviesen enmarcados dentro un programa de gestión de la finca.

## **Agradecimientos**

Este trabajo fue financiado por el Ministerio de Agricultura contrato 10320080296-315, agradecimientos a los productores del corregimiento de Aragón y a la administración Municipal del Santa Rosa de Osos.

## **REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS**

- Andrew S.; A. Frobis; M. Paape; L. Maturin, 1997. Evaluation of selected antibiotic residue screening tests for milk from individual cows and examination of factors that affect the probability of false-positive outcomes. *Journal of dairy science*. 80, 3050-3057.
- Bennedsgaard T.; C. Enevoldsen; S. Thamsborg; M. Vaarst, 2003. Effect of mastitis treatment and somatic cell counts on milk yield in Danish organic dairy cows. *Journal of dairy science*. 86, 3174-3183.



- Blowey R., P. Edmondson. Control de la mastitis en granjas de vacuno de leche: Acibia, Zaragoza ; 1999, p 27-28
- Codex alimentarius. código de prácticas de higiene para la leche y los productos lácteos Normas Alimentarias FAO/OMS. Disponible en URL [http://www.codexalimentarius.net/web/index\\_es.jsp](http://www.codexalimentarius.net/web/index_es.jsp).
- Craigmill A., G. Miller, R. Gehring, A. Pierce, J. Riviere, 2004: Meta analysis of pharmacokinetic data of veterinary drugs using the Food Animal Residue Avoidance Databank: oxytetracycline and procaine penicillin G. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*. 27, 343-353.
- Elagamy E., 2000. Effect of heat treatment on camel milk proteins with respect to antimicrobial factors: a comparison with cows' and buffalo milk proteins. *Food Chemistry*. 68, 227-232.
- Fabre J.; J. Moretain; F. Ascher; P. Broquillet; X. Berthelot, 1995. Main causes of inhibitors in milk: A survey in one thousand French dairy farms.. *International Dairy Federation*.1995. 27-31.pp.
- Faria J., K. Valero-Leal G. Dpool, A. García; M. Allara. 2005. Sensibilidad a los agentes antimicrobianos de algunos patógenos mastitogénicos aislados de leche de cuartos de bovinos mestizos doble propósito. *Rev. Cientif. FCV-LUZ*. XV (3). 227-234.
- FEDEGAN 2008 [http://portal.fedegan.org.co/portal/page?\\_pageid=93,1&\\_dad=portal&\\_schema=PORTAL](http://portal.fedegan.org.co/portal/page?_pageid=93,1&_dad=portal&_schema=PORTAL)
- Food Agriculture Organization (FIL-FAO). Guide to good farming practice. Food Agriculture Organization of the United Nations. Roma. 2004.
- García A., 2004: Células somáticas y alto recuento bacteriano. ¿Cómo controlarlo. *J. Dairy Sci*. 4031-4035.
- Gibbons-Burgener S.; J. Kaneene; J. Lloyd; J. Leykam; R. Erskine, 2001. Reliability of three bulk-tank antimicrobial residue detection assays used to test individual milk samples from cows with mild clinical mastitis. *American journal of veterinary research*. 62, 1716-1720.
- ISO/CD 13969. Milk and Milk Products – Guidance for the standardized description of microbial inhibitor tests. International Organization for Standardization, 1998.
- Kang J.; J. Jin; F. Kondo, 2005. False-positive outcome and drug residue in milk samples over withdrawal times. *Journal of dairy science*. 88, 908-913.
- Pikkemaat M., 2009. Microbial screening methods for detection of antibiotic residues in slaughter animals. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 395, 893-905.

- Resolución 0012 de 2007. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Colombia. Por el cual se establece el sistema de pago de la leche cruda al productor. [http://www.minagricultura.gov.co/04normatividad/04b\\_resolu.aspx](http://www.minagricultura.gov.co/04normatividad/04b_resolu.aspx)
- Schallibaum M., 2001. Impact of SCC on the quality of fluid milk and cheese. *Proc 40th Annu Meet Nat Mastitis Counc.* 38–46.
- Santos M.; Y. Ma; D. Barbano, 2003. Effect of Somatic Cell Count on Proteolysis and Lipolysis in Pasteurized Fluid Milk During Shelf-Life Storage<sup>1</sup>. *Journal of dairy science.* 86, 2491-2503.

### **REDVET: 2010, Vol. 11 N° 12**

Recibido 11.06.10 / Ref. prov. JUN1022B\_RED VET / Revisado 16.10.10 / Aceptado 16.11.10  
Ref. def. 121009\_RED VET / Publicado: 01.12.2010

Este artículo está disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n121210.html> concretamente en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n121210/121009.pdf>

REDVET® Revista Electrónica de Veterinaria está editada por Veterinaria Organización®.  
Se autoriza la difusión y reenvío siempre que enlace con Veterinaria.org® <http://www.veterinaria.org> y con REDVET® - <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>