



UNIVERSIDAD  
POLITECNICA  
DE VALENCIA

## MASTER EN PRODUCCIÓN ANIMAL

# EVALUACIÓN DE LOS MÉTODOS DE UNIÓN A RECEPTORES PROTEICOS PARA LA DETECCIÓN DE ANTIBIÓTICOS EN LA LECHE CRUDA DE CABRA

Tesis de Master  
Valencia, Julio 2012

**Darjaniva Fernández Molina**

Directora Académica:

M<sup>a</sup> Pilar Molina Pons

Directora Experimental:

M<sup>a</sup> Carmen Beltrán Martínez

Este trabajo forma parte del proyecto AGL2009-11524 financiado por el Ministerio de  
Ciencia e Innovación

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios y a la Virgen, por vivir en mi corazón, guiar mi camino y darme vida y salud para poder realizar mis metas.

A los ángeles que desde el cielo me cuidan y me protegen: Abuelos, tíos, Sr. Armando.

A mis Viejos Magdiel y Darjaniva, y mis hermanos Magdiel y Bárbara, nada de esto hubiese sido posible sin Uds. Gracias por su inmenso apoyo, entrega, por ese amor consentidor inigualable que me dan, por cada palabra de ánimo, por tener confianza en mí y creer en mis sueños. Son el mejor ejemplo a seguir. Los Amo.

A Luis Alejandro, por su inmenso apoyo y compañía a pesar de la distancia. Gracias por lograr reducir con amor esos km que no separan.

A la UPV, por la oportunidad de ser una estudiante de tan prestigiosa casa de estudios.

A mi directora, Pilar Molina Pons, por sus conocimientos y dedicación.

A Mari Carmen Beltrán, por su amistad, su tiempo, su entrega e incansable espíritu de trabajo y enseñanza. Gracias Mari por hacerme disfrutar cada minuto de todo este estudio y compartir conmigo tus conocimientos.

A Cristofol Peris, por su apoyo.

A mis amigos hechos en España: Ignacio, Carlos, Dyana, Hernán, Juan Pablo y Paula, por su amistad inigualable, compañía y apoyo.

A todos mis compañeros del Departamento de Ciencia Animal: Tamara, Mila, Ion...  
Gracias chicos!

## RESUMEN

En los últimos años la calidad de la leche de cabra ha cobrado mayor relevancia, ya que la industria exige una materia prima con características adecuadas para su transformación, así como por una mayor exigencia de los consumidores.

Debido a la importancia de la presencia de residuos de medicamentos en la leche tanto para la salud pública como para los procesos tecnológicos de fabricación de productos lácteos, la legislación europea establece una serie de controles sobre la detección de inhibidores en la leche a nivel de explotaciones ganaderas, centros lácteos y laboratorios acreditados.

Los métodos empleados en estos controles han sido desarrollados para leche de vaca y la información es muy limitada para leche de otras especies, por lo que se consideró interesante realizar un estudio de evaluación de los métodos de unión a receptores proteicos más empleados en España (Charm MRL BL/TET, BetaStar Combo, SNAP Betalactam, SNAP Tetracycline, SNAP Gentamicin y Twinsensor<sup>BT</sup>) con leche cruda de cabra, en base a la especificidad (falsos positivos), capacidad de detección (CC $\beta$ ) de antibióticos betalactámicos y tetraciclinas y el efecto del conservante azidol sobre la respuesta de estos métodos de control.

En el estudio de especificidad (resultados negativos/totales x 100) se analizaron un total de 350 muestras individuales de leche de cabra el mismo día de su recogida, mediante los métodos de cribado seleccionados para este trabajo, siguiendo el protocolo de ejecución descrito por cada uno de los fabricantes.

Los métodos de unión a receptores proteicos con muestras individuales de leche de cabra presentan porcentajes elevados de especificidad, tanto para la detección de antibióticos betalactámicos como para la de tetraciclinas. En betalactámicos, el método BetaStar Combo resultó ser el más específico (99%), seguido del Charm MRL BL/TET (98%), y del SNAP Betalactam (95%). El Twinsensor<sup>BT</sup> obtuvo una especificidad más baja (87%), debido a un elevado número de resultados falsos positivos, lo que indica que este método es poco específico para la detección de betalactámicos en muestras individuales de leche de cabra. En el caso de las tetraciclinas, tanto el método Charm MRL BL/TET como el SNAP Tetracycline presentaron una especificidad de 100%, el Twinsensor<sup>BT</sup> de 99,7% y el BetaStar Combo de 99%, lo que permite señalar que estos métodos son altamente específicos para la detección de residuos de tetraciclinas en muestras individuales de leche de cabra.

Para calcular la Capacidad de detección (CC $\beta$ ) de los métodos considerados, se analizó en primer lugar una concentración de antibiótico equivalente a 0.5xLMR, realizando un total de 20 repeticiones. Si el error  $\beta$  era >5% (1 resultado negativo), se analizaba la siguiente concentración de ensayo correspondiente a 0.75xLMR, con 40 repeticiones. De igual manera, si el error  $\beta$  era >5% (2 resultados negativos), se procedía a analizar una concentración equivalente al LMR ensayando en este caso, un total de 60 repeticiones. Si el error  $\beta$  >5% (3 resultados negativos), se concluía que el

CC $\beta$  era mayor que el LMR establecido para la sustancia en cuestión. Los LMR utilizados en este estudio fueron los establecidos por la legislación europea en el Reglamento (UE) 37/2010.

La Capacidad de detección (CC $\beta$ ) de los métodos de unión a receptores proteicos para los antibióticos betalactámicos y tetraciclinas en muestras individuales de leche de cabra, varía según el método y la sustancia evaluada. Para los betalactámicos, el SNAP Betalactam y el Twinsensor<sup>BT</sup> mostraron ser capaces de detectar todos los antibióticos analizados a niveles inferiores o iguales al LMR, mientras que el Charm MRL BL/TET no fue capaz de detectar la cloxacilina al LMR y el BetaStar Combo ni la cefalexina ni el ceftiofur. Para el grupo de las tetraciclinas, el método Charm MRL BL/TET detectó todas las sustancias analizadas a niveles inferiores al LMR, mientras que los métodos SNAP Tetracycline, BetaStar Combo y Twinsensor<sup>BT</sup> no fueron capaces de detectar la presencia de clortetraciclina a una concentración equivalente al LMR.

Para evaluar el efecto del conservante azidol sobre la respuesta de los métodos de unión a receptores proteicos, se utilizaron 20 muestras individuales de leche de cabra libres de antibióticos. Las muestras de leche se dividieron en dos alícuotas, una sin conservante y otra con azidol, que se analizaron con cada uno de los métodos considerados. Posteriormente, las mismas muestras de leche fueron adicionadas de penicilina G y oxitetraciclina en concentraciones equivalentes al LMR (4 $\mu$ g/Kg y 100g/Kg, respectivamente) y se analizaron nuevamente con los métodos de cribado seleccionados.

El conservante azidol no tuvo ningún efecto sobre la respuesta de los métodos de unión a receptores proteicos evaluados (Charm MRL BL/TET, BetaStar Combo, SNAP y Twinsensor<sup>BT</sup>) con muestras individuales de leche de cabra adicionadas o no de antibiótico. Sin embargo, en el método SNAP Betalactam se observó que al agregar azidol a las muestras de leche, se retrasaba la aparición de los puntos de lectura lo que obliga a prolongar el tiempo de análisis. Además, la intensidad de dichos puntos fue menor en las muestras de leche adicionadas de conservante.

Debido a la importancia de la presencia de residuos de medicamentos en la leche para la Seguridad Alimentaria, es conveniente continuar con los estudios sobre métodos de detección de residuos de antimicrobianos, a fin de evitar la llegada de leche de cabra con residuos de antibióticos a la cadena alimenticia.

# **Índices**

## INDICE GENERAL

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
1. La Calidad de la leche de cabra	1
1.1 Aspectos Generales	1
1.2 Características físico-químicas y composición de la leche de cabra	1
1.3 Calidad higiénico-sanitaria de la leche de cabra	2
2. CONTROL DE CALIDAD Y TRAZABILIDAD DE LA LECHE	3
2.1 Generalidades	3
2.2 Tipos de control	3
3. DETECCIÓN DE LA PRESENCIA DE RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS EN LA LECHE	5
3.1 Importancia de la presencia de residuos de antibióticos en la leche	5
3.2 Sistema de detección	5
3.3 Métodos de unión a receptores proteicos	8
3.3.1 Fundamento y procedimiento de los métodos	8
3.3.2 Características de funcionamiento de los métodos	9
3.3.2.1 Especificidad	9
3.3.2.2 Capacidad de detección (CCβ)	11
II. OBJETIVOS	15
III. MATERIALES Y MÉTODOS	17
3.1 Diseño Experimental	17
3.2 Muestras de leche	17
3.3 Sustancias antimicrobianas y muestras fortificadas	18
3.4 Métodos de unión a receptores proteicos	19
3.4.1 BetaStar Combo	19
3.4.2 Charm MRL BL/TET	20
3.4.3 SNAP (Betalactam, Tetracycline y Gentamicin)	21
3.4.4 Twinsensor	22
3.5 Análisis estadístico	23
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
1. Especificidad de los métodos de unión a receptores en leche de cabra	25
1.1 BetaStar Combo	25
1.2 Charm MRL BL/TET	27
1.3 SNAP (Betalactam, Tetracycline y Gentamicin)	28
1.4 Twinsensor <sup>BT</sup>	29
2. Capacidad de detección (CCβ) de antibióticos de los métodos de unión a receptores proteicos en la leche de cabra	32
2.1 BetaStar Combo	32
2.2 Charm MRL BL/TET	33

2.3 SNAP (Betalactam, Tetracycline y Gentamicin)	35
2.4 Twinsensor <sup>BT</sup>	36
3. Efecto del azidiol sobre la respuesta de los métodos de unión a receptores proteicos en leche de cabra	37
3.1 BetaStar Combo	37
3.2 Charm MRL BL/TET	38
3.3 SNAP (Betalactam, Tetracycline y Gentamicin)	39
3.4 Twinsensor <sup>BT</sup>	41
V. CONCLUSIONES	44
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	47

**INDICE DE CUADROS**

	Pág.
<b>Cuadro 1.</b> Parámetros físicos-químicos de la leche de vaca y cabra	1
<b>Cuadro 2.</b> Parámetros de calidad higiénica en la leche cruda	3
<b>Cuadro 3.</b> Límites máximo de residuos establecidos en la Unión Europea en la leche	6
<b>Cuadro 4.</b> Clasificación de los métodos analíticos en función de las características de funcionamiento	9
<b>Cuadro 5.</b> Sustancias antimicrobianas usadas para la determinación del CCβ	19
<b>Cuadro 6.</b> Características de la leche de cabra utilizada en el estudio de la especificidad del método BetaStar Combo	25
<b>Cuadro 7.</b> Resultados obtenidos en el estudio de la especificidad para el método BetaStar Combo	25
<b>Cuadro 8.</b> Características de la leche de cabra utilizada en el estudio de la especificidad del método Charm MRL BL/TET	27
<b>Cuadro 9.</b> Resultados obtenidos en el estudio de la especificidad para el método Charm MRL BL/TET	27
<b>Cuadro 10.</b> Resultados obtenidos en el estudio de la especificidad para el método SNAP Betalactam	29
<b>Cuadro 11.</b> Resultados obtenidos en el estudio de la especificidad para el método Twinsensor <sup>BT</sup>	30
<b>Cuadro 12.</b> Efecto de las características de la leche sobre la incidencia de resultados "falsos positivos" en el método Twinsensor <sup>BT</sup>	32
<b>Cuadro 13.</b> Capacidad de Detección (CCβ) del método BetaStar Combo para antibióticos betalactámicos y tetraciclinas en leche de cabra	33
<b>Cuadro 14.</b> Capacidad de Detección (CCβ) del método Charm MRL BL/TET para antibióticos betalactámicos y tetraciclinas en leche de cabra	34
<b>Cuadro 15.</b> Capacidad de Detección (CCβ) del método SNAP (Betalactam, Tetracycline y Gentamicin) para antibióticos betalactámicos y tetraciclinas en leche de cabra	35
<b>Cuadro 16.</b> Capacidad de Detección (CCβ) del método Twinsensor <sup>BT</sup> para antibióticos betalactámicos y tetraciclinas en leche de cabra	37



## INDICE DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Componentes de la leche de cabra Murciano-Granadina	2
<b>Figura 2.</b> Clasificación de los métodos de detección de inhibidores de la leche	7
<b>Figura 3.</b> Modelo de curva dosis-respuesta para el cálculo del límite de detección de los métodos de cribado	11
<b>Figura 4.</b> Estudio del efecto del azidiol sobre los métodos de unión a receptores proteicos en leche de cabra	18
<b>Figura 5.</b> Procedimiento del método BetaStar Combo	20
<b>Figura 6.</b> Procedimiento del método Rosa Charm MRL BL/TET	21
<b>Figura 7.</b> Procedimiento del método SNAP	22
<b>Figura 8.</b> Procedimiento del método Twinsensor <sup>BT</sup>	22
<b>Figura 9.</b> Evolución de la especificidad del método BetaStar Combo en leche de cabra a lo largo del período de lactación.	25
<b>Figura 10.</b> Evolución de la especificidad del método Rosa Charm MRL BL/TET en leche de cabra a lo largo del período de lactación.	28
<b>Figura 11.</b> Evolución de la especificidad del método SNAP en leche de cabra a lo largo del período de lactación	30
<b>Figura 12.</b> Evolución de la especificidad del método Twinsensor <sup>BT</sup> en leche de cabra a lo largo de la lactación	31
<b>Figura 13.</b> Efecto del azidiol sobre la respuesta del método BetaStar Combo para leche de cabra sin antibiótico	38
<b>Figura 14.</b> Lecturas obtenidas en el estudio del azidiol en el BetaStar Combo para leche de cabra con penicilina G y oxitetraciclina	38
<b>Figura 15.</b> Efecto del azidiol sobre la respuesta del método Charm MRL BL/TET para leche de cabra	39
<b>Figura 16.</b> Efecto del azidiol sobre la respuesta del método SNAP Betalactam para leche de cabra sin antibiótico y con penicilina G	40
<b>Figura 17.</b> Efecto del azidiol sobre la respuesta del método SNAP Tetracycline para leche de cabra sin antibióticos y con oxitetraciclina	40
<b>Figura 18.</b> Efecto del azidiol sobre la respuesta del método SNAP Gentamicin en leche de cabra sin antibiótico y con gentamicina	41
<b>Figura 19.</b> Lecturas $\beta$ y T obtenidas en el estudio del azidiol del método Twinsensor <sup>BT</sup> en leche de cabra	41

# **Introducción**

## I. INTRODUCCIÓN

### 1. LA CALIDAD DE LA LECHE DE CABRA

#### 1.1. Aspectos generales

La leche de cabra y sus derivados son recursos alimentarios que han recibido en los últimos años una mayor atención mundial. Su producción se ha incrementado notablemente en las últimas dos décadas y ello está contribuyendo cada vez más, a mejorar la economía de productores, industriales y a incrementar el aporte nutricional en varios sectores de consumidores.

En los últimos años la calidad de la leche de cabra ha cobrado mayor importancia debido a la demanda por parte de la industria de una materia prima con características adecuadas para su transformación, así como por una mayor exigencia de los consumidores. Las industrias han ido generalizando el pago de la leche a los productores en base a su calidad y, por otra parte, la normativa europea vigente establece la obligatoriedad de controlar la calidad de la leche cruda que los ganaderos proporcionan a la industria.

La calidad de la leche cruda de cabra debe analizarse desde dos aspectos: el bioquímico, es decir, características físico-químicas y composición química, y el higiénico-sanitario.

#### 1.2. Características físico-químicas y composición de la leche de cabra

La leche de cabra producida en España se destina prácticamente en su totalidad a la elaboración de productos lácteos derivados, fundamentalmente quesos. En ese sentido, disponer de información sobre las características y composición química de la leche cruda resulta esencial para la industria quesera, ya que le permite una mejora y desarrollo continuados.

En el Cuadro 1 se presentan los parámetros físico-químicos que se emplean en la valoración de la calidad de la leche cruda de vaca y cabra, los cuales señalan ciertas características importantes como son el grado de frescura y la calidad higiénica (pH y acidez), así como también la detección de fraudes por adición de agua (densidad y punto crioscópico).

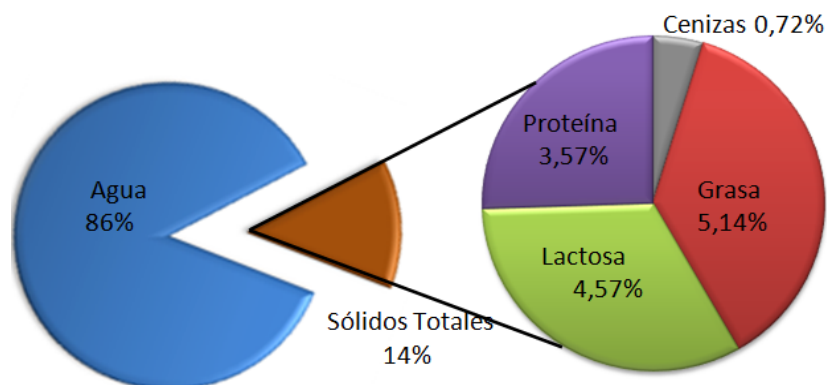
A su vez, la composición química de la leche tiene una gran importancia ya que determina su calidad nutritiva y muchas de sus propiedades. De igual manera, la aptitud tecnológica de la leche para su transformación en queso depende, en gran medida, de su composición, especialmente de su contenido en grasa y proteína que son los parámetros que presentan una mayor relación con el rendimiento quesero.

**Cuadro 1.** Parámetros físico-químicos de la leche de vaca y cabra

Componente	Vaca	Cabra
Acidez (°D)	16	14
pH	6,6	6,7
Punto Crioscópico (-°C)	0,521	0,549
Densidad (g/ml)	1,028	1,033

Fuente: Luquet (1993)

En la Figura 1 se presenta la composición química de la leche de cabra de la Raza Murciano-Granadina. Los porcentajes de la figura deben considerarse como valores medios orientativos, ya que como comenta Boza (1997), los componentes de la leche de cabra varían de forma natural a lo largo de la lactación, viéndose además afectados por numerosos factores, como el tipo y la época de parto, la edad del animal y la alimentación, entre otros.



**Figura 1.** Componentes de la leche de cabra Murciano-Granadina  
Fuente: Elaboración propia según datos de Vert (2004) y ACRIMUR (2010)

Se observa que el mayor componente en la leche de cabra es el agua con un valor medio de 86%. A su vez, los sólidos totales representan el 14% y sus constituyentes mayoritarios son la grasa y la lactosa con 5,14% y 4,57%, respectivamente, seguidos de la proteína con un 3,57% y por último las cenizas 0,72%.

Con respecto a los componentes que presentan mayor relación con el rendimiento quesero, la leche de cabra tiene mayor contenido en materia grasa y proteína bruta que la leche de vaca, sin embargo, su contenido de proteína coagulable es ligeramente más bajo (Luquet, 1993; Quiles y Hevia, 1994).

### 1.3 Calidad higiénico-sanitaria de la leche de cabra

La leche desde su secreción en el interior de la ubre hasta su llegada al consumidor, se ve sometida a un elevado número de riesgos (desarrollo de microorganismos, infecciones por gérmenes, absorción de olores extraños, producción de malos sabores, presencia de sustancias químicas extrañas como antibióticos, detergentes, desinfectantes, pesticidas, metales, partículas de suciedad, etc.) lo que puede afectar de forma negativa la calidad higiénica del producto.

El Reglamento correspondiente a la higiene de los alimentos de origen animal destinados a la alimentación humana (CE 853/2004) realiza una valoración de la calidad higiénica de la leche cruda en base a su contenido en gérmenes totales, células somáticas y residuos de antibióticos. Asimismo, establece unos valores máximos (Cuadro 2), para que la leche pueda ser comercializada en el ámbito de la Unión europea (UE).

**Cuadro 2. Parámetros de calidad higiénica en la leche cruda**

Parámetro	Vaca	Oveja y Cabra	
Recuento gérmenes totales (ufc/ml) <sup>1</sup>	100.000	500.000 <sup>3</sup>	1.500.000 <sup>4</sup>
Recuento células somáticas (cel/ml) <sup>2</sup>	400.000	-	
Presencia de antibióticos	Ausencia de residuos por encima de los límites de seguridad establecidos en la UE		
<sup>1</sup> Media geométrica observada durante un periodo de dos meses con un mínimo de dos determinaciones al mes; <sup>2</sup> Media geométrica observada durante un periodo de tres meses con, al menos, una determinación al mes; <sup>3</sup> Cuando el proceso de elaboración de los productos derivados no incluye ningún tratamiento térmico; <sup>4</sup> Cuando el proceso de elaboración de los productos derivados incluye tratamiento térmico.			

Fuente: Reglamento (CE) 853/2004

**Recuento de Gérmenes Totales (RGT):** En el caso de la leche de oveja y cabra, los límites corresponden a 500.000 ufc/ml para la leche destinada a la elaboración de productos derivados sin tratamiento térmico y a 1.500.000 ufc/ml para la leche destinada a productos que incluyan en su elaboración algún tipo de tratamiento térmico; ambos valores son muy superiores al valor límite de 100.000 ufc/ml establecido para la leche cruda de vaca.

**Recuento de Células Somáticas (RCS):** constituye un buen indicador del nivel sanitario de los animales, principalmente en relación a la presencia de mamitis. El Reglamento (CE) 853/2004, sobre las normas de higiene aplicables a los alimentos de origen animal, establece para la leche cruda de vaca un valor máximo de 400.000 cel/ml. En el caso del ganado ovino y caprino la situación no está tan clara y la legislación aún no ha establecido los valores máximos exigibles.

**Presencia de residuos de antibióticos:** es otro de los aspectos considerados en la legislación para valorar la calidad higiénica de la leche cruda. Molina y col. (2010) indican que, la principal causa de la presencia de estas sustancias en la leche es la utilización de medicamentos veterinarios a base de antibióticos y sulfonamidas para el tratamiento de las enfermedades infecciosas del ganado, especialmente la mamitis y que estos tratamientos, constituyen una práctica muy generalizada que puede ocasionar la contaminación de la leche si no se toman las medidas de protección adecuadas.

## 2. CONTROL DE LA CALIDAD Y TRAZABILIDAD DE LA LECHE

### 2.1. Generalidades

Actualmente, en España, el control de la trazabilidad y calidad es de obligado cumplimiento para la leche cruda de vaca (Reales Decretos 217/2004 y 1728/2007) y también, para la leche de oveja y cabra (Real Decreto 752/2011).

En estos Reales Decretos se establece la normativa básica de control que deben cumplir los operadores del sector de leche cruda de estas especies. En ellos, se regula la identificación y el registro de los agentes, establecimientos y contenedores que intervienen en el sector lácteo, así como el registro de los movimientos de la leche cruda. También se creó la herramienta que permite establecer la trazabilidad de la leche cruda de vaca en España, el Módulo de trazabilidad de la "base de datos Letra Q" (Leche, TRAzabilidad, Quality), que es una aplicación informática integrada en el

sistema de información “Letra Q”, donde están registrados todos los agentes y contenedores del sector lácteo.

El Real Decreto 752/2011 permite desarrollar los reglamentos comunitarios relativos a la higiene de los alimentos en el ámbito nacional de la producción de leche cruda de cabra y oveja, estableciendo los controles mínimos obligatorios a realizar por los agentes productores de estos alimentos, así como armonizar las condiciones exigibles a los laboratorios de análisis de leche cruda de cabra y oveja, y la actuación homogénea de los mismos ante la toma de muestras, análisis y comunicación al órgano competente. También se describen los aspectos relacionados con la toma de muestras a fin de uniformizar las mismas en los laboratorios, así como el uso de conservantes como el azidol, especificando la composición y dosis.

Adicionalmente, se extiende al caprino y al ovino de leche la obligación establecida en el Real Decreto 1728/2007 de transmitir a la “base de datos Letra Q” los resultados generados en la ejecución de los diversos controles, que sólo era aplicable al sector lácteo bovino.

## **2.2. Tipos de control**

El Real Decreto 752/2011 establece que deben existir **controles obligatorios en las explotaciones** (autocontroles) antes de cargar la leche cruda en la cisterna de transporte, donde será obligatorio realizar una verificación de parámetros para comprobar que la leche reúne las características adecuadas. Se debe realizar una inspección visual comprobando el color, olor, apariencia de la leche cruda y ausencia de contaminación macroscópica. También se medirá la temperatura de la leche en el tanque de frío, se comprobará la limpieza del tanque y si existe sospecha de deterioro microbiológico, se podrá realizar la prueba de la acidez o la de la estabilidad al alcohol. Además según el plan de muestreo establecido, se recogerá una muestra de leche para su envío al laboratorio y también se realizará la prueba de detección de inhibidores “in situ”.

De igual manera se efectúan **controles obligatorios en los centros lácteos** donde se realizarán las mismas verificaciones visuales y de calidad comentadas anteriormente, antes de proceder a la descarga de la leche. En este caso se tomará de cada cisterna, muestra para su envío al laboratorio y se realizará la prueba de residuos de antibióticos betalactámicos en todas las descargas y cada cinco cisternas, la prueba de residuos de tetraciclinas, asegurando que todas las rutas de recogida de la leche queden analizadas.

Sobre las muestras de leche enviadas al laboratorio, se determinará su calidad comercial (composición) y su calidad higiénico-sanitaria (recuento de gérmenes totales, recuento de células somáticas y presencia de inhibidores) y la información obtenida deberá registrarse en la “base de datos letra Q”.

Cabe señalar que, a pesar de que en el Reglamento (CE) 853/2004 no se especifica un valor umbral para el recuento de células somáticas en la leche de oveja y cabra, el Real Decreto 752/2011 establece la obligación de comunicar los valores de este parámetro con el fin de mejorar la

transparencia de las relaciones entre los agentes que forman parte de la cadena de producción así como para la obtención de un banco de datos referente a este parámetro.

### **3. DETECCIÓN DE LA PRESENCIA DE RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS EN LA LECHE**

#### **3.1 Importancia de la presencia de residuos de antibióticos en la leche**

En la leche se pueden encontrar residuos de diferentes medicamentos y otras sustancias químicas debidos al tratamiento de los animales con diferentes fármacos, así como los que proceden de la utilización de detergentes y/o desinfectantes. En estos momentos, los residuos más importantes que aparecen en la leche son los residuos de medicamentos veterinarios, especialmente los antimicrobianos que consecuentemente, son un riesgo para la salud pública y los procesos de industrialización lechera (Litterio y col., 2004).

Respecto a la **Salud pública**, la presencia de residuos de antimicrobianos en la leche puede producir efectos negativos sobre la salud humana como afecciones alérgicas, gastrointestinales, intoxicaciones y el desarrollo de resistencias a los agentes microbianos. (Anthony y col., 2001 y Demoly y Romano, 2005).

Por otro lado, desde una visión **tecnológica**, inhibe los procesos bacterianos necesarios en la elaboración de productos derivados como el queso y el yogur y retrasa procesos como la acidificación, el cuajado y la maduración, llegando incluso a inhibir completamente la fermentación en algunos casos (Grunwald y col., 2003 y Berruga y col., 2009).

También es de gran importancia la presencia de residuos de antibióticos en la leche para el propio **ganadero o productor de leche**, ya que puede llevar a la prohibición por parte de las autoridades sanitarias, de la comercialización de la leche cruda al ser calificada como “no apta para consumo humano”, según la Legislación.

O'Donnell (2007) señala que los residuos de antibióticos deben ser monitoreados para evitar que la leche contaminada llegue a la cadena alimenticia humana y la mejor manera es a través de pruebas de rápida ejecución que detecten dichos residuos.

Como ya se ha comentado, debido a que los residuos de antibióticos en la leche representan un riesgo potencial para los consumidores, para la industria lechera y para el ganadero, los países miembros de la Unión Europea están obligados a controlar oficialmente su presencia para asegurar que están por debajo del límite máximo de residuos (LMR) establecido.

El límite máximo de residuos (LMR) se define en el Reglamento (CE) 470/2009 como *“la concentración máxima de residuo de una sustancia farmacológicamente activa (expresado en  $\mu\text{g}/\text{kg}$  o  $\text{g}/\text{kg}$  sobre la base del peso en fresco) que puede permitirse en los alimentos de origen animal”*; se establece para cada producto (carne, leche, etc.) y es específica para cada especie animal (vacuno, ovino, caprino, etc.)

En el Cuadro 3, se pueden observar los Límites Máximos de Residuos (LMR) establecidos en la Unión Europea para diferentes sustancias antimicrobianas en la leche.

**Cuadro 3.** Límites Máximos de Residuos (LMR) establecidos en la Unión Europea para la leche.

Sustancia	LMR µg/kg (ppb)	Leche	Sustancia	LMR µg/kg (ppb)	Leche
<b><u>Beta-lactámicos</u></b>			<b><u>Macrólidos</u></b>		
Penicilina	4	Todas*	Eritromicina	40	Todas
Ampicilina	4	Todas	Espiramicina	200	Vaca
Amoxicilina	4	Todas	Tilmicosina	50	Todas
Penetamato	4	Vaca	Tilosina	50	Todas
Nafcilina	30	Vaca	Lincomicina	150	Todas
Cloxacilina	30	Todas	Pirlimicina	100	Vaca
Dicloxacilina	30	Todas			
Oxacilina	30	Todas	<b><u>Aminoglucósidos</u></b>		
Cefacetilo	125	Vaca	Gentamicina	100	Vaca
Cefalexina	100	Vaca	Kanamicina	150	Vaca
Cefalonio	20	Vaca	Neomicina	1500	Todas
Cefoperazona	50	Vaca	Espectinomicina	200	Oveja
Ceftiofur	100	Vaca	Estreptomicina	200	Vaca
Cefquinoma	20	Vaca			
Cefapirina	60	Vaca	<b><u>Quinolonas</u></b>		
Cefazolina	50	Vaca	Danofloxacina	30	Vaca
			Enrofloxacina	100	Vaca
			Flumequina	50	Vaca
<b><u>Tetraciclinas</u></b>			Marbofloxacina	75	Vaca
Doxiciclina	0	Todas			
Clortetraciclina	100	Todas	<b><u>Otros</u></b>		
Oxitetraciclina	100	Todas	Ácido clavulánico	200	Vaca
Tetraciclina	100	Todas	Bacitracina	100	Vaca
			Baquiloprim	30	Vaca
<b><u>Sulfamidias</u></b>			Cloranfenicol	0	Todas
Sulfadiacina	100	Vaca	Colistina	50	Todas
Sulfadimetoxina	100	Vaca	Dapsona	0	Todas
Sulfadimina	100	Vaca	Florfenicol	0	Todas
Sulfadoxina	100	Vaca	Novobiocina	50	Vaca
Sulfanilamida	100	Vaca	Rifaximina	60	Vaca
Sulfametazina	100	Vaca	Tianfenicol	50	Vaca
Sulfatiazol	100	Vaca	Trimetoprim	50	Todas

\*Todas= leche correspondiente a todas las especies ganaderas

Fuente: Reglamento UE 37/2010

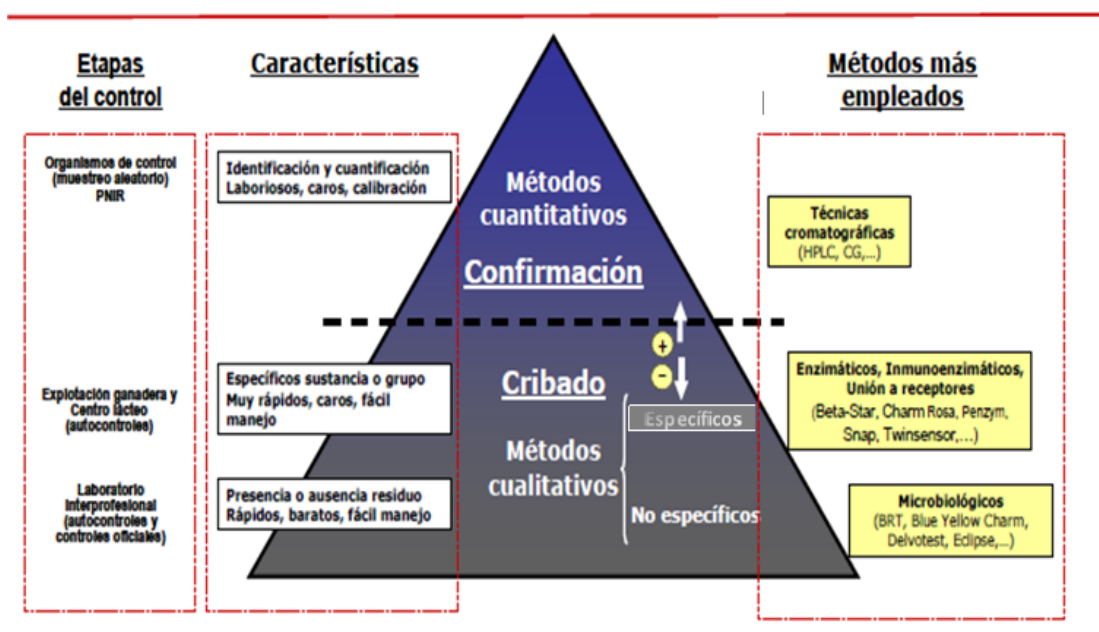
### 3.2 Sistemas de Detección

Para el control de la presencia de residuos de antibióticos en la leche se distinguen dos fases (Figura 2). Una primera que se conoce como etapa de cribado y de confirmación preliminar donde se utilizan, en especial, métodos microbiológicos cualitativos con la finalidad de determinar la presencia o ausencia de residuos por encima de los LMR y, también, métodos específicos (“rápidos”) que son capaces de identificar sustancias o incluso familias de antimicrobianos de una forma más específica. La segunda fase es de confirmación y cuantificación donde se emplean métodos fisicoquímicos que se utilizan para identificar de forma inequívoca la presencia de estos residuos en la leche y determinar exactamente la cantidad de analito presente en las muestras (Beltrán, 2010).



También la Unión Europea a partir de la Decisión 2002/657/CEE clasifica los métodos analíticos de detección de sustancias inhibitoras en la leche como métodos cualitativos o cuantitativos, en función de las características de funcionamiento de cada uno de ellos.

Los métodos microbiológicos de cribado fueron los primeros métodos utilizados para la detección de residuos de antibióticos. Están basados fundamentalmente en pruebas de inhibición del crecimiento de un microorganismo específico, empleando para la detección de esta inhibición, diversos sistemas como indicadores de pH, redox, bioluminiscencia, etc. Estos métodos aprovechan la capacidad de las bacterias de producir ácido, reducir colorantes o producir halos de inhibición en un medio de cultivo, de manera que el resultado se puede interpretar visualmente. El BRT, Delvotest o Eclipse, son algunos de los métodos más utilizados hoy en día y todos ellos emplean el *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*, antes denominado *Bacillus stearothermophilus* (Nazina y col., 2001), como microorganismo de prueba.



**Figura 2.** Clasificación de los métodos de detección de inhibidores en la leche

Fuente: Molina y col. (2010)

Por otro lado, entre los métodos específicos cualitativos utilizados en la fase de cribado, existen actualmente en el mercado distintos tipos de métodos enzimáticos, inmunoenzimáticos, de unión a receptores, etc., que permiten detectar de una forma más específica y por lo general mucho más rápida, la presencia de residuos de antibióticos y sulfonamidas en la leche (Roca, 2008). Entre los métodos más importantes se encuentra el enzimático Penzym y otro grupo de métodos inmunoenzimáticos, ELISA o RIA, así como los métodos de unión a receptores proteicos, de gran desarrollo en la actualidad, entre los que destacan el método ROSA Charm, BetaStar, SNAP y Twinsensor<sup>BT</sup>.

Todos estos métodos utilizados para la detección de residuos de antimicrobianos en la leche han sido desarrollados y evaluados para ser utilizados con leche de vaca. En el caso de la leche de cabra y oveja se emplean estos mismos métodos sin que se hayan llevado a cabo, en muchos casos, estudios de evaluación para su uso en estas especies y, en caso necesario, una adaptación u optimización de las condiciones operativas.

### **3. 3 Métodos de unión a receptores proteicos**

#### **3.3.1 Fundamento y procedimiento de los métodos**

Los métodos de unión a receptores proteicos llamados coloquialmente “métodos rápidos”, son métodos que permiten analizar la presencia o no de antibióticos en la leche de una manera sencilla, rápida, confiable, de fácil interpretación de los resultados y que no requiere de personal capacitado para su uso. Actualmente son los que se emplean con mayor frecuencia para los análisis en las explotaciones ganaderas y centros lácteos.

Los más utilizados en España son: ROSA Charm, BetaStar, Snap y Twinsensor<sup>BT</sup>. Todos presentan diferentes versiones que son capaces de detectar antibióticos pertenecientes al grupo de los betalactámicos y/o tetraciclinas o métodos combinados que identifican simultáneamente, antibióticos de ambos grupos.

Generalmente utilizan la tecnología de flujo lateral y están basados en la unión del antibiótico problema a receptores proteicos conjugados a una enzima que son específicos para un antibiótico determinado (Mitchell y col., 1998). En el método BetaStar y Twinsensor<sup>BT</sup> los receptores proteicos están enlazados a partículas de oro.

Se diferencian en el tiempo de incubación que varía entre 5 y 9 minutos, siendo el BetaStar el de menor tiempo de incubación (5 minutos), también en la temperatura de incubación que va de 40 a 56°C, así como en el formato en el que se presentan, mayormente en tiras reactivas u otros dispositivos como es el caso del SNAP.

Todos permiten efectuar la interpretación visual de los resultados por la intensidad de las bandas coloreadas y ofrecen la posibilidad de realizar la lectura de resultados mediante equipos automáticos que proporcionan lecturas de forma más objetiva.

En la mayoría de estos métodos de control hay dos fases de incubación, a excepción del método ROSA (Rapid One Step Assay) Charm que como su nombre indica, realiza todo el análisis en su solo paso. En el resto de los métodos, en la primera fase se pone en contacto la muestra de leche con el receptor dando como resultado la interacción de los posibles antibióticos que contenga la muestra con el receptor.

En la segunda fase, la muestra de leche junto con los receptores es transferida a la tira reactiva o dispositivo que contiene una línea control y una línea para antibióticos betalactámicos y/o para tetraciclinas (según el grupo para el que sea específico para un solo antibiótico o combinado, que permite la detección simultánea de ambos grupos de antibióticos; en este último caso la tira reactiva

presenta tres líneas (línea betalactámicos, línea control y línea tetraciclinas). Al añadir la tira reactiva en esta segunda fase del análisis, es cuando la línea específica a antibióticos betalactámicos y/o tetraciclinas captura todos los receptores específicos que no han interactuado con el antibiótico durante la primera fase.

La línea control sirve como referencia para determinar si la muestra es negativa o positiva. En general, si la línea específica de cada antibiótico es más intensa que la línea control, la muestra se considera negativa y por el contrario, si la línea de los antibióticos tiene una intensidad menor que la línea de control, la muestra se considera como positiva.

### 3.3.2 Características de funcionamiento de los métodos

La Decisión 2002/657/CE establece las principales características de funcionamiento que se deben tener en cuenta para la validación de métodos analíticos, siendo estas características la especificidad, capacidad de detección (CC $\beta$ ), límite de decisión (CC $\alpha$ ), veracidad, robustez, y estabilidad. Dependiendo del tipo de método analítico a validar estas características son de determinación obligatoria o no (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Clasificación de los métodos analíticos en función de las características de funcionamiento

		Capacidad de detección (CC $\beta$ )	Límite de decisión (CC $\alpha$ )	Veracidad	Precisión	Especificidad	Robustez/ estabilidad
<b>Métodos cualitativos</b>	S	+	-	-	-	+	+
	E	+	+	-	-	+	+
<b>Métodos cuantitativos</b>	S	+	-	-	+	+	+
	E	+	+	+	+	+	+

S= métodos de criba; E= métodos específicos; += determinación obligatoria

Fuente: Decisión 2002/657/EC

Las características de funcionamiento de los métodos de unión a receptores proteicos estudiadas en este trabajo, especificidad y capacidad de detección (CC $\beta$ ), se describen en los apartados siguientes.

#### 3.3.2.1 Especificidad

También conocida como selectividad, está asociada a la presencia de resultados conocidos como “falsos positivos” y resulta de gran interés para evaluar la capacidad analítica de un método. Para su determinación se deben analizar un elevado número de muestras de leche que tienen que cumplir una serie de condiciones, en especial, que procedan de animales no tratados con medicamentos veterinarios (UNE-EN ISO, 2003 a y b).

Según Sischo y col. (1993), la especificidad se calcula como la frecuencia relativa porcentual de los resultados negativos obtenidos, dividido por el número total de muestras analizadas. Además, otros autores, la definen como la capacidad de un método para detectar muestras negativas cuando realmente son negativas (Trullols y col., 2004).

Muchos son los factores que pudieran intervenir en la aparición de resultados “falsos positivos” en animales no tratados, como la etapa de lactación y las características propias de la leche de cada especie como la composición, presencia de inhibidores naturales, etc. (Althaus y col., 2003).

Otro factor a tener en cuenta es la presencia de conservantes en la leche. Schiffman y col. (1992) señalan que la presencia de conservantes en muestras de leche puede provocar fallos en la interpretación de los resultados de los métodos provocando la reducción del color dando resultados dudosos o positivos.

Actualmente no se han encontrado estudios que indiquen si el uso de conservantes en las muestras de leche influye o no sobre el comportamiento de los métodos de unión a receptores proteicos. En métodos microbiológicos, Zorraquino (1997) realizó un estudio sobre la influencia del efecto de la adición de azidiol como conservante de las muestras de leche de vaca sobre las lecturas fotométricas de las respuestas del método BRT y dedujo que, las muestras de leche adicionadas de azidiol parecen presentar lecturas de absorbancia más elevadas que aquellas analizadas sin conservante.

También Molina y col. (2003), estudiaron el efecto del uso de dos conservantes, dicromato potásico y azidiol, sobre la respuesta de los métodos BRT AiM y Delvotest en leche oveja y determinaron que el dicromato potásico inhibía totalmente el crecimiento del *Geobacillus stearothermophilus* mientras que con el azidiol, se obtenía una menor especificidad analizando muestras adicionadas de conservante (90,2%) que cuando se analizaban muestras sin conservante (96,3%) en el método BRT y también en el Delvotest, que presentó una especificidad de 91% con muestras de leche con azidiol y de 97,7% con muestras de leche sin conservante.

En cuanto a la especificidad de los métodos de unión a receptores proteicos, Contreras y col. (1997) con muestras de leche de cabra, obtuvieron una especificidad de 100% para el método SNAP Betalactam. También, Zeng y col. (1998) con muestras de leche de cabra, indican para este método de control una especificidad superior al 90%.

Berruga y col. (2009) analizaron muestras de leche de oveja con diferentes métodos de unión a receptores proteicos específicos a antibióticos betalactámicos y/o tetraciclinas (ROSA Charm BL, Twinsensor<sup>BT</sup> y SNAP) y obtuvieron especificidades elevadas para la detección de betalactámicos: 99% para el método SNAP Betalactam, 95% para el Twinsensor<sup>BT</sup> y 90% para el ROSA Charm BL.

De igual manera para las tetraciclinas, la especificidad en muestras de leche de oveja también resultó elevada: 96% para SNAP Tetracycline, 97% para Twinsensor<sup>BT</sup> y 99% para el ROSA Charm TET.

Por su parte Reybroeck y col. (2010) en un estudio de validación del método BetaStar en su versión simplificada 1+1, obtiene un 100% de especificidad al analizar muestras de distintos tipos de

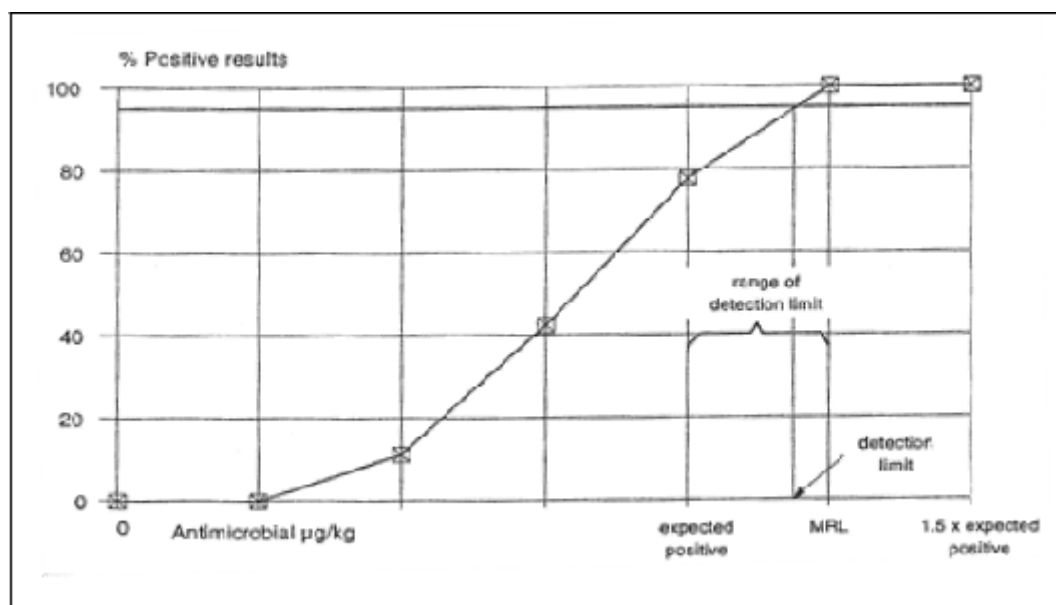
leche de vaca (UHT, esterilizada, reconstituida en polvo, descongelada) y también leche de cabra y oveja.

### 3.3.3.2 Capacidad de detección (CC $\beta$ )

Según la Decisión 2002/657/CE, se entiende por Límite de detección o Capacidad de detección (CC $\beta$ ) al contenido mínimo de una sustancia que puede ser detectado, identificado o cuantificado en una muestra, con una probabilidad de error  $\beta$ . El error  $\beta$  es la probabilidad de que la muestra analizada sea realmente no conforme, aunque se haya obtenido una medición conforme. En los métodos de cribado, el error  $\beta$  no debería ser mayor al 5% (CRLs, 2010).

En el caso de sustancias para las que no se ha establecido un límite permitido, la capacidad de detección (CC $\beta$ ) es la concentración mínima en la que un método puede detectar muestras realmente contaminadas con una certeza estadística de  $1-\beta$ . En el caso de sustancias para las que se ha establecido un límite permitido, la capacidad de detección es la concentración en la que un método puede detectar límites de concentración permitidos con una certeza estadística de  $1-\beta$  (Decisión 2002/657/CE).

Existen diferentes criterios para el cálculo de la Capacidad de detección (CC $\beta$ ) de un método de cribado cualitativo. Las normas UNE-EN ISO (2003 a y b) proponen un procedimiento de cálculo que contempla la utilización de diferentes concentraciones de antibiótico, con objeto de construir una curva dosis-respuesta (Figura 3) a partir de las frecuencias relativas de resultados positivos para cada concentración de antibiótico ensayada, realizando un total de 10-20 repeticiones si la lectura de resultados es visual y de 3-5 si es fotométrica.



**Figura 3.** Modelo de curva dosis-respuesta para el cálculo del límite de detección de los métodos de cribado

Fuente: UNE-EN ISO 13969 y 18330 (2003 a, b)

Entre las concentraciones de ensayo debe incluirse un control negativo, una concentración que sea al menos de 1,5 a 2 veces superior a la concentración que se espera resulte positiva y una concentración equivalente al LMR, calculándose el Límite de detección como la concentración que corresponde a la intersección de la curva dosis-respuesta, con la línea que representa el 95% de resultados positivos.

Por otra parte, los laboratorios de referencia de la Comunidad europea (CRLs, 2010) proponen unas directrices de cálculo en las que se determina la frecuencia de resultados positivos a una concentración de antibiótico determinada (Screening Target Concentration), comprendida entre el 50 y el 100% del LMR, de manera que el CC $\beta$  se corresponde con la menor concentración ensayada que produce un 95% de resultados positivos. A diferencia del procedimiento propuesto por las normas ISO (2003 a y b), la máxima concentración de ensayo es equivalente al LMR y el número de repeticiones a realizar depende de la relación que está tenga con el LMR: 20 repeticiones si la concentración de ensayo es menor o igual al 50% del LMR, 40 repeticiones si está comprendida entre el 50 y el 90% y 60 repeticiones si representa entre el 91 y el 100% del LMR.

Por otra parte, muchos autores reseñan la Capacidad de Detección (CC $\beta$ ) de los métodos con la sensibilidad. La sensibilidad es un parámetro que resulta de gran utilidad para evaluar la capacidad de un método para detectar la presencia de un determinado fármaco a un nivel equivalente al LMR en una muestra de leche.

Para el cálculo de la sensibilidad, la Federación Internacional de Lechería (IDF, 1997) especifica que debe determinarse sobre 30 réplicas de una misma muestra de leche, adicionadas de una concentración equivalente al LMR de la sustancia objeto de estudio. La sensibilidad se determina como el cociente porcentual del número de muestras positivas al método, respecto del total de muestras analizadas.

Los métodos de unión a receptores proteicos están basados en la utilización de receptores con una especificidad ajustada en base de los niveles de tolerancia de los EEUU o de los límites máximos de Residuos establecidos en la legislación europea.

Estos métodos han sido evaluados con muestras de leche de vaca presentando unos buenos resultados de sensibilidad para la detección de antibióticos betalactámicos y tetraciclinas. Así, Zvirdauskien y Salomskiene (2007), al evaluar el método BetaStar, concluyen que este método permite detectar penicilina G, oxacilina, ampicilina, nafcilina, cefquinoma, cloxacilina, dicloxacilina, cefapirina, cefacettrilo, cefoperazona y cefalonio a concentraciones inferiores a los LMRs establecidos en la legislación. Con este mismo método y siguiendo un procedimiento simplificado de ensayo, Reybroeck y col. (2010) obtienen una alta sensibilidad para diferentes antibióticos betalactámicos en diferentes tipos de leche (UHT, esterilizada, reconstituida en polvo, descongelada) y también en leche de cabra y oveja.

Por su parte, Perme y col. (2010), también obtiene muy buenos resultados de sensibilidad con el método combinado Twinsensor<sup>BT</sup> diseñado para la detección simultánea de betalactámicos y

tetraciclinas en muestras de leche, ya que los CC $\beta$  obtenidos para diferentes sustancias antimicrobianas fueron inferiores a los LMRs establecidos en la legislación.

Sin embargo, la evaluación de la capacidad de detección de estos métodos con leche de oveja y de cabra es muy limitada y sería de gran importancia conocer la influencia de los factores que pueden interferir en la respuesta de estos métodos de control con este tipo de leche.

Considerando la importancia de la presencia de residuos de antibióticos en la leche y la escasa disponibilidad de información sobre el comportamiento de los métodos de unión a receptores proteicos con muestras de leche de cabra, sería de gran interés conocer los factores que pudieran estar relacionados con la aparición de resultados “falsos positivos” en este tipo de leche que afecten al productor, o con los resultados “falsos negativos” que representen un peligro para la salud del consumidor. De igual manera, se necesita mayor información para poder establecer una normativa adecuada para el caso del control de la leche de cabra, con objeto de evitar la llegada de residuos de antibióticos a la leche y, de este modo, colaborar con uno de los principios básicos de la Seguridad Alimentaria, la protección de los consumidores.

# **Objetivos**



## II. OBJETIVOS

Dada la importancia de la presencia de residuos de medicamentos en la leche tanto para la salud pública como para los procesos tecnológicos de fabricación de productos lácteos, la legislación europea establece una serie de controles sobre la detección de inhibidores en la leche a nivel de explotaciones ganaderas, centros lácteos y laboratorios acreditados.

Los métodos empleados para la realización de estos controles han sido desarrollados y evaluados para leche de vaca siendo la información para la leche de otras especies ganaderas muy limitada. Por ello, se consideró interesante realizar un estudio sobre la “Evaluación de los métodos de unión a receptores proteicos para la determinación de antibióticos en la leche cruda de cabra”.

De una manera más específica, los objetivos de este trabajo han sido los siguientes:

- Estudiar la especificidad de los métodos de unión a receptores proteicos más empleados en España (BetaStar Combo, Charm MRL BL/TET, SNAP y Twinsensor<sup>BT</sup>) en leche cruda de cabra.
- Evaluar la Capacidad de detección (CC $\beta$ ) de los métodos de unión a receptores proteicos (BetaStar Combo, Charm MRL BL/TET, SNAP y Twinsensor<sup>BT</sup>) de diferentes antibióticos betalactámicos y tetraciclinas en leche cruda de cabra.
- Analizar el efecto del conservante azidol sobre la respuesta de los métodos de unión a receptores proteicos (BetaStar Combo, Charm MRL BL/TET, SNAP y Twinsensor<sup>BT</sup>) en leche de cabra con y sin antibióticos.

# **Materiales y métodos**

### **III. MATERIALES Y METODOS**

#### **3.1. Diseño Experimental**

Dado que el presente estudio pretende evaluar el funcionamiento de los métodos de unión a receptores proteicos más empleados en España con leche cruda de cabra, el diseño experimental se planteó en base al estudio de los parámetros siguientes:

- Un primer experimento para determinar la especificidad (determinación de los resultados “falsos positivos”) de cada uno de los métodos de unión a receptores proteicos empleados en el estudio.
- Un segundo experimento para establecer la Capacidad de detección ( $CC\beta$ ) de los métodos de unión a receptores proteicos utilizados en este estudio, para los antibióticos betalactámicos y tetraciclinas más empleados en el ganado caprino lechero.
- Un tercer experimento para evaluar el efecto del conservante Azidiol sobre la respuesta de los métodos de unión a receptores proteicos con leche de cabra sin antibiótico y con antibiótico (betalactámicos y tetraciclinas).

#### **3.2 Muestras de leche**

Para los experimentos, se utilizaron muestras individuales de leche procedentes del ordeño mecánico de la mañana del rebaño de cabras de la Raza Muciano-Granadina existente en la Granja experimental de pequeños rumiantes del Departamento de Ciencia Animal de la Universitat Politècnica de Valencia.

Las muestras se recogieron de animales sanos y no tratados con ningún medicamento desde la segunda semana post-parto hasta el final del período de lactación (7 meses), con una frecuencia quincenal.

Las muestras de leche se analizaron en el Laboratorio de Análisis de Leche de la Universitat Politècnica de Valencia para determinar su composición química (grasa, proteína bruta, lactosa, y sólidos totales) y su calidad higiénica (recuento de células somáticas y recuento de gérmenes totales), garantizando que cumplieran con los requisitos de composición y calidad señalados en la norma UNE-EN ISO 18330 (2003b) que establece las directrices para la descripción normalizada de los inmunoensayos de receptores para la detección de residuos de antimicrobianos en leche y productos lácteos.

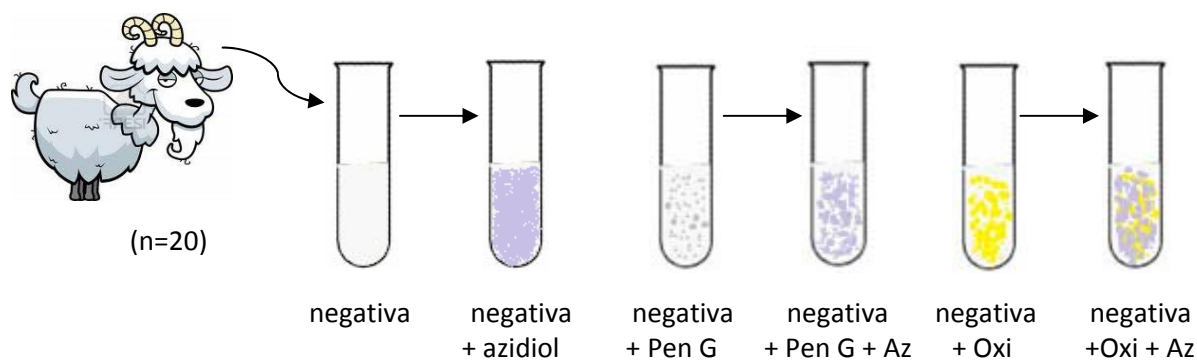
La composición química de la leche se determinó mediante la utilización del MilkoScan FT 120 (Foss. Hillerød, Denmark), el recuento de células somáticas con el equipo automático Fossomatic 5000 (Foss. Hillerød, Denmark) y el recuento de gérmenes totales, con el Bactoscan FC (Foss. Hillerød, Denmark). El pH se determinó con un pHmetro convencional (Crison. Barcelona, España).

En el estudio de **especificidad** se analizaron un total de 350 muestras individuales de leche de cabra. Cada muestra se analizó individualmente el mismo día de su recogida mediante los métodos seleccionados para este trabajo según el protocolo de ejecución descrito por cada fabricante.

Para medir la **Capacidad de detección (CC $\beta$ )** fueron seguidas las directrices de las Guías de validación de los métodos de cribado para la detección de residuos de medicamentos veterinarios, propuestas por los laboratorios de referencia de la Comunidad europea (CRLs, 2010).

En primer lugar se analizó una concentración de antibiótico correspondiente a 0.5xLMR realizando un total de 20 repeticiones. Si el error  $\beta$  era >5% (1 resultado negativo), se analizaba la siguiente concentración de ensayo correspondiente a 0.75xLMR, con 40 repeticiones. De igual manera, si el error  $\beta$  era >5% (2 resultados negativos), se procedía a analizar una concentración equivalente al LMR ensayando un total de 60 repeticiones. En este caso, si el error  $\beta$  >5% (3 resultados negativo), se determinaba que el CC $\beta$  era mayor que el LMR establecido para la sustancia en cuestión. Los LMR utilizados en este estudio fueron los establecidos por la legislación europea en el Reglamento (UE) 37/2010.

Para evaluar el **efecto del conservante azidiol** sobre la respuesta de los métodos de unión a receptores proteicos, se utilizaron 20 muestras individuales de leche de cabra libres de antibióticos. Las muestras de leche se dividieron en dos alícuotas, una sin conservante y otra con azidiol (Figura 4), y se analizaron con cada uno de los métodos considerados. Posteriormente, las mismas muestras de leche fueron adicionadas de penicilina G y oxitetraciclina en concentraciones equivalentes al LMR (4 $\mu$ g/Kg y 100g/Kg, respectivamente) y se analizaron nuevamente con los métodos de cribado seleccionados.



**Figura 4.** Estudio del efecto del azidiol en métodos de unión a receptores proteicos en leche de cabra

### 3.3 Sustancias antimicrobianas y muestras de leche fortificadas

Las sustancias antimicrobianas seleccionadas, en función de la importancia de su uso, para el estudio de la sensibilidad de los métodos de unión a receptores proteicos, junto a sus respectivos Límites Máximo de Residuos establecidos por la normativa vigente, se presentan en el Cuadro 5.

Para la preparación de las muestras fortificadas de cada uno de los antibióticos estudiados, se siguieron las recomendaciones de la Federación Internacional de Lechería (IDF, 1991), de modo que

el volumen añadido de la disolución de un fármaco determinado no superase el 1% del volumen de solución final de leche resultante.

Para la preparación de las soluciones de antibióticos, se pesaron 25mg de cada sustancia teniendo en cuenta su pureza, que se disolvieron en un matraz aforado de 25 ml utilizando agua destilada o un disolvente apropiado (Cuadro 5), obteniéndose así las soluciones “madre” de cada uno de los antibióticos. A partir de éstas, se prepararon las soluciones intermedias necesarias para conseguir la concentración de ensayo requerida en cada caso. Todas las soluciones antibióticas fueron preparadas en el momento de realizar los análisis para evitar problemas relacionados con la estabilidad de las sustancias antimicrobianas.

**Cuadro 5.** Sustancias antimicrobianas usadas para la determinación de la Capacidad de Detección (CCB)

Antimicrobiano	Nombre	Referencia Comercial <sup>(*)</sup>	Solvente
Beta-lactámicos	Amoxicilina	A8523	H <sub>2</sub> O
	Ampicilina	A9518	H <sub>2</sub> O
	Cloxacilina	C9393	H <sub>2</sub> O
	Penicilina G	PEN-Na	H <sub>2</sub> O
	Cefalonium	32904	NaOH 0,1N
	Cefapirina	43989	H <sub>2</sub> O
	Cefoperazona	32426	NaOH 1N
	Ceftiofur	34001	NaOH 0,1N
Tetraciclina	Chlortetraciclina	C4881	NaOH 0,1N
	Oxitetraciclina	O4636	HCl 0,1N
	Tetraciclina	T3258	HCl 0,1N

<sup>(\*)</sup> Todos los antimicrobianos utilizados fueron suministrados por Sigma-aldrich (Bornem, Bélgica)

### 3.4 Métodos de unión a receptores proteicos

Se seleccionaron cuatro métodos de unión a receptores proteicos: BetaStar Combo, ROSA Charm MRL BL/TET, SNAP (Betalactam, Tetracycline y Gentamicin) y Twinsensor<sup>BT</sup>.

Sus fundamentos, procedimientos de análisis e interpretación de resultados se señalan en los apartados siguientes.

#### 3.4.1 BetaStar Combo

El método BetaStar Combo (Neogen Corporation. Lansing, EEUU), es un método de receptores proteicos específico para la determinación rápida de antibióticos betalactámicos y tetracilinas en muestras de leche.

Se presenta en un formato de 25 viales que contienen los receptores y un bote de 25 tiras reactivas para la determinación de los antibióticos.

El procedimiento de ensayo del BetaStar Combo es sencillo y consiste en colocar en el vial que contiene los receptores, 200 µL de muestra de leche para realizar una primera incubación a 47.5°C

en un calentador suministrado por la casa comercial, durante un tiempo de 2 minutos. Posteriormente se coloca la tira reactiva dentro del vial y se realiza una segunda incubación durante 3 minutos más.

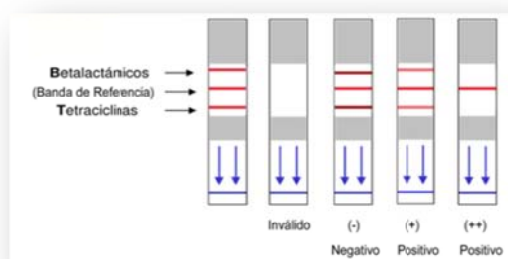
Al finalizar el periodo de incubación, se extrae la tira del vial, se retira la esponjita del extremo de la tira y se realiza inmediatamente después la interpretación de los resultados, bien de manera visual o mediante la utilización del lector AccuScan III Reader (Neogen Corporation). El procedimiento de ensayo del método BetaStar Combo se observa en la Figura 5.



**Figura 5.** Procedimiento del método BetaStar Combo

La interpretación visual de los resultados se realiza de la siguiente manera:

- Si las bandas de la muestra son más intensas o igual que la banda de referencia, la muestra se considera negativa.
- Si las bandas de la muestra tienen una intensidad menor que la banda de referencia, la muestra es interpretada como positiva.
- Si por el contrario la banda de referencia no se ve reflejada en la tira, el test se considera como inválido.



### **3.4.2 Charm MRL BL/TET**

El método ROSA (Rapid One Step Assay) Charm MRL BL/TET (Charm Sciences Inc., Massachussets, EEUU), permite la detección simultánea de antimicrobianos betalactámicos y tetraciclinas a niveles de los LMRs establecidos en la Unión Europea. Utiliza la tecnología de difusión por flujo lateral y se presenta mediante tiras de papel cromatográfico en la que están embebidos todos los ingredientes del método.

Para realizar este método, se colocan en un tubo eppendorf, 300µL de la muestra de leche y 300µL de un buffer de dilución específico para leche de cabra, suministrada por el fabricante. La mezcla se agita hasta homogenizar y se refrigera a 4°C durante un tiempo de 10 minutos. Posteriormente, se toman 300µL de la mezcla y se colocan en la tira de papel previamente situada en el incubador (ROSA Incubator. Charm Science, Inc.) regulado a una temperatura de 56°C.

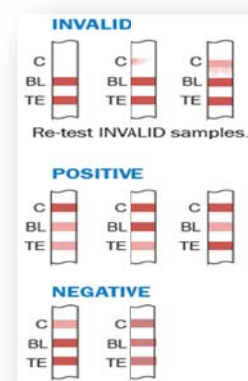
Transcurrido el tiempo de incubación (16 minutos) se procede a la lectura de los resultados tanto de forma visual como a través del lector ROSA Pearl Reader (Charm Sciences, Inc.). En la Figura 6 se observa el procedimiento empleado para la realización de este método.



**Figura 6.** Procedimiento del método Charm MRL BL/TET

La muestra se valorará como positiva o negativa, dependiendo de la intensidad de las bandas coloreadas de la siguiente forma:

- Si la banda de la muestra es más intensa o igual que la banda control, la muestra se considera negativa.
- Si la banda de la muestra tiene una intensidad menor que la banda control, la muestra es interpretada como positiva.
- Si la banda control no se observa o bien está incompleta, el resultado es interpretado como invalido.



### 3.4.3 SNAP (Betalactam, Tetracycline y Gentamicin)

El método SNAP en sus versiones Betalactam, Tetracycline y Gentamicin (IDEXX Laboratories, Inc. Westbrook, EEUU) ha sido desarrollado para la detección de antibióticos betalactámicos, tetraciclinas y gentamicina, respectivamente. Se presenta en empaques individuales que contienen un tubo con la pastilla del receptor, una pipeta de plástico para dosificar la muestra de leche y el dispositivo del test.

Para la realización de este método hay que colocar 400µL de la muestra de leche en el tubo que contiene los receptores, agitar para disolverlos y colocar en el bloque calefactor regulado a 45°C durante un tiempo de 5 minutos para SNAP Betalactam y SNAP Tetracycline y de 2 minutos para el SNAP Gentamicin. El dispositivo SNAP también se mantiene en el incubador, junto al tubo de muestra, durante todo este tiempo.

Transcurrida la primera incubación, se vierte el contenido del tubo dentro del pocillo de prueba del dispositivo SNAP. La fluye a través de la ventana de resultados hacia el círculo de activación. Cuando el círculo de activación empieza a desaparecer, se presiona el activador y se realiza una segunda incubación que dura 4 minutos para el SNAP Betalactam y SNAP Tetracycline mientras que para el SNAP Gentamicin, es de 7 minutos.

Posteriormente, se realiza la lectura de manera visual y con el lector SNAP shot (IDEXX Laboratories, Inc.) que da como resultado un ratio comprendido entre "0" y ">5" indicando si la

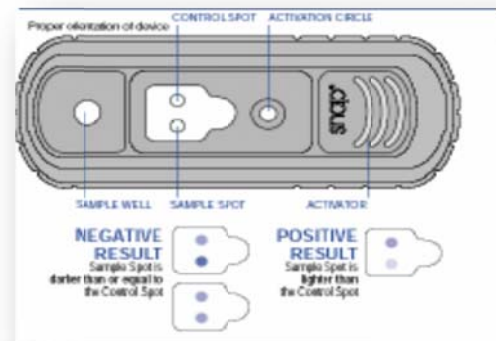
muestra de leche es positiva o negativa. En la Figura 7 se muestra el procedimiento del método SNAP.



**Figura 7.** Procedimiento del método SNAP

Visualmente se pueden interpretar los resultados de la manera siguiente:

- Si el punto de muestra es más intenso o igual que el punto control, la muestra se considera negativa.
- Si el punto de muestra es de menor intensidad que el punto control, la muestra se considera positiva.



#### 3.4.4 Twinsensor<sup>BT</sup>

El método Twinsensor<sup>BT</sup> (Unisensor. Lieja, Bélgica) es un análisis que involucra dos receptores en una sola operación. Utiliza dos elementos que comprenden un pocillo que contiene cierta cantidad de ambos receptores ligados a partículas de oro y una tira que compone un conjunto de membranas donde hay tres líneas de captura (una línea para betalactámicos, una línea control y otra para las tetraciclinas).

Para la realización del test se colocan 200µL de leche en cada pocillo, se mezclan y se realiza una primera incubación de 3 minutos de duración, a una temperatura de 40°C en el incubador temporizado Heat Sensor (Unisensor). A continuación, se sumerge la tira en el pocillo permitiendo que la leche fluya a través de ella realizando una segunda incubación durante otros 3 minutos.

Transcurrido este tiempo, se retira la tira del pocillo y se procede a la lectura visual de los resultados y con el lector Read Sensor (Unisensor), indicando si la muestra es positiva o negativa a betalactámicos y/o tetraciclinas. En la Figura 8 se muestra el procedimiento del método Twinsensor<sup>BT</sup>

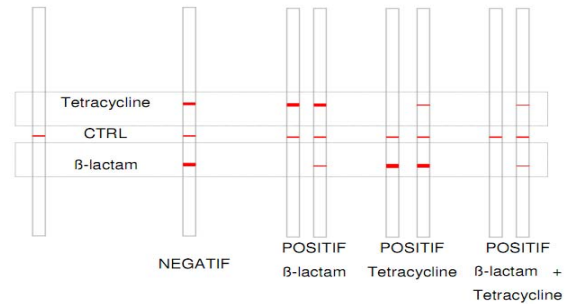


**Figura 8.** Procedimiento analítico del método Twinsensor<sup>BT</sup>



La interpretación visual de los resultados se realiza de la siguiente manera:

- Si las bandas de la muestra son más intensas o igual que la banda control, la muestra se considera negativa a los dos antibióticos.
- Si las bandas de la muestra son de menor intensidad que la banda control, la muestra es interpretada como positiva a betalactámicos y/o a tetraciclinas.



### 3.5 Análisis Estadístico

Los cálculos de las medias, desviaciones estándar, máximos y mínimos de la composición de la leche de cabra, del recuento de células somáticas y de los gérmenes totales, se realizaron con el análisis multidimensional del paquete estadístico Statgraphics 5.1 (2001). En el caso de las células somáticas y de los gérmenes totales, se empleó el logaritmo decimal del recuento.

Para analizar las posibles causas de los resultados “falsos positivos” obtenidos, se realizó un estudio del efecto de la semana de lactación y de las características fisicoquímicas de la leche de cabra sobre la respuesta de los métodos de unión a receptores proteicos, en aquellos que presentaron una especificidad menor o igual a 95%. Dado que las respuestas de estos métodos son variables categóricas (“positivo” o “negativo”), se realizó un análisis de regresión logística mediante la aplicación correspondiente del programa de tratamiento estadístico de datos Statgraphics 5.1 (2001).

El modelo utilizado fue el siguiente:

$$Li = \text{logit} [Pi] = \beta_0 + \beta_1 [\text{semana}] + \beta_2 [\text{pH}] + \beta_3 [G] + \beta_4 [P] + \beta_5 [L] + \beta_6 [ST] + \beta_7 [\text{logRCS}] + \beta_8 [\text{logRGT}] + \epsilon_i$$

Donde:

logit [P<sub>i</sub>]= probabilidad de resultado positivo de un método; β<sub>i</sub>= coeficientes estimados por el modelo; semana<sub>i</sub>= estado de la lactación, pH<sub>i</sub>= valores de pH, G<sub>i</sub>= grasa; P<sub>i</sub>= proteína; L<sub>i</sub>= lactosa; ST<sub>i</sub>= sólidos totales; logRCS<sub>i</sub>= logaritmo decimal del recuento de células somáticas; logRGT<sub>i</sub>= logaritmo decimal del recuento de gérmenes totales y ε<sub>i</sub>= error del modelo.

## **Resultados y Discusión**

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. ESPECIFICIDAD DE LOS MÉTODOS DE UNIÓN A RECEPTORES PROTEICOS EN LECHE DE CABRA

#### 1.1. BetaStar Combo

Para el cálculo de la especificidad del método BetaStar Combo se utilizaron un total de 350 muestras de leche de cabra libres de antibióticos.

En el Cuadro 6 se resume la composición química y la calidad higiénica de las muestras de leche de cabra utilizadas en el estudio de especificidad de este método. Estos valores se encuentran dentro del rango especificado por diferentes autores para la leche de cabra de raza Murciano-Granadina (Quiles y Hevia, 1994; Vert, 2004; Boza, 2007).

**Cuadro 6.** Características de la leche de cabra utilizada en el estudio de la especificidad del método BetaStar Combo

Parámetros	Media	SD	Mínimo	Máximo
pH	6,79	0,09	6,50	7,14
Grasa (%)	5,60	1,16	3,23	11,44
Proteína (%)	3,72	0,48	2,44	5,36
Sólidos Totales (%)	14,65	1,55	11,05	20,48
RGT ( $\times 10^3$ ufcl/ml)	75	200	10	2.289
Log RGT	4,56	0,40	4	6,35
RCS ( $\times 10^3$ cel/ml)	1.019	1.536	75	15.456
Log RCS	5,76	0,42	4,87	7,18

SD: Desviación estándar; RGT: Recuento de gérmenes totales, SCC: Recuento de células somáticas

En el Cuadro 7 se presentan los resultados de especificidad para el método BetaStar Combo con muestras de leche de cabra según la interpretación visual de los resultados y la realizada mediante la utilización del lector AccuScan III Reader (Neogen Corporation).

**Cuadro 7.** Resultados obtenidos en el estudio de la especificidad para el método BetaStar Combo

	Betalactámicos						Tetraciclina				
	Visual			Lector			Visual			Lector	
	P	D	N	P	N	P	D	N	P	N	
Clasificación muestras <sup>(1)</sup>	4	5	341	3	347	3	1	346	3	347	
Negativas/Total muestras	341/350			347/350			346/350			347/350	
Especificidad (%)	97			99			98			99	

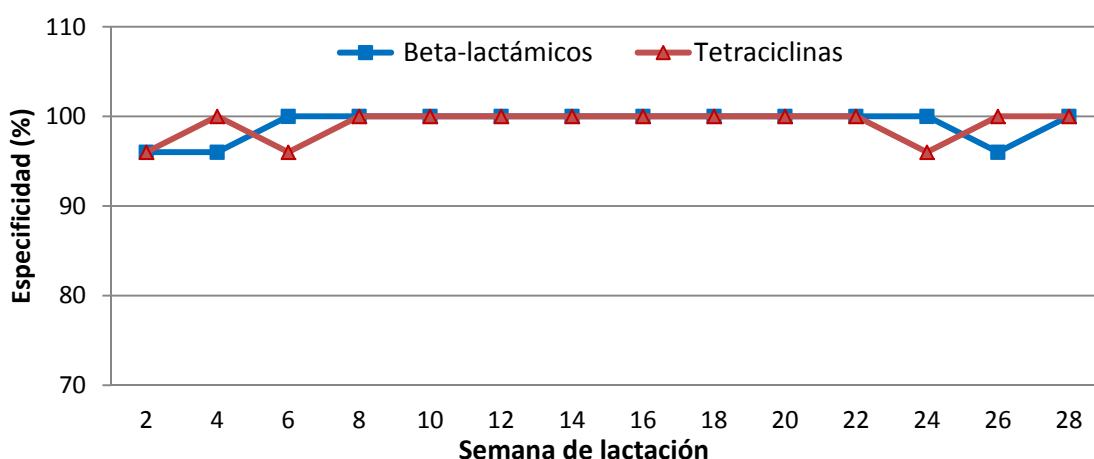
<sup>(1)</sup>Clasificación muestras: P=positiva, D=dudosa y N=negativa

Para la detección de antibióticos betalactámicos, la especificidad calculada a partir de la interpretación visual de los resultados fue de 97% mientras que cuando se utiliza la lectura instrumental de resultados, la especificidad aumenta hasta el 99%. Se observa que con la utilización del lector se obtiene un menor porcentaje de resultados positivos al discriminar mejor las muestras de interpretación visual dudosa, aunque esta diferencia no llegó a ser estadísticamente significativa ( $p>0.05$ ).

Estos resultados son similares a los obtenidos por Sternesjö y Johnsson (2003) en un método similar de la misma firma comercial para la detección rápida de betalactámicos en leche de vaca (BetaStar, Neogen Corporation), quienes calcularon una especificidad de 99.9% en muestras de leche de tanque. Más recientemente, Borrás (2011), obtiene una menor especificidad para este mismo método (97%) con muestras individuales de leche de vaca.

En el caso de la detección de los antibióticos del grupo de las tetraciclinas, también se observa una mayor especificidad cuando ésta se calcula a partir de la lectura instrumental de resultados (99% lectura instrumental vs 98% lectura visual) aunque en este caso la diferencia tampoco llegó a ser estadísticamente significativa ( $p>0.05$ ).

En la Figura 9 se presenta la evolución de la especificidad calculada con leche de cabra a partir de las lecturas instrumentales del método BetaStar Combo a lo largo de la lactación. En ella se puede observar que los resultados positivos obtenidos (3) se encuentran en el primer y último mes de la lactación tanto para los antibióticos betalactámicos (semanas 4 y 26) como para los del grupo de las tetraciclinas (semana 6 y 24), aunque el reducido número de estos resultados no permite ningún tipo de conclusión.



**Figura 9.** Evolución de la especificidad del método BetaStar Combo en leche de cabra a lo largo del período de lactación

### 1.2 Charm MRL BL/TET

Las características de las 350 muestras individuales de leche de cabra empleadas para el cálculo de la especificidad del método Charm MRL BL/TET se presentan en el Cuadro 8.

Las muestras de leche de cabra utilizadas en este estudio presentaron una composición química y una calidad higiénica similar a la señalada por otros autores (Quiles y Hevia, 1994; Vert, 2004; Boza, 2007) para la leche de cabra.

**Cuadro 8.** Características de la leche de cabra utilizada en el estudio de la especificidad del método Charm MRL BL/TET

Parámetros	Media	SD	Mínimo	Máximo
pH	6,78	0,09	6,55	7,13
Grasa (%)	5,74	1,16	3,31	10,61
Proteína (%)	3,82	0,48	2,68	6,03
Sólidos Totales (%)	15,0	1,51	12,13	20,48
RGT ( $\times 10^3$ ufc/ml)	74	306	10	4.829
Log RGT	4,5	0,40	4,0	6,68
RCS ( $\times 10^3$ cel/ml)	975	1.737	37	16.837
Log RCS	5,68	0,49	4,57	7,23

SD: Desviación estándar; RGT: Recuento de gérmenes totales, RCS: Recuento de células somáticas

En el Cuadro 9 se presentan los resultados obtenidos en el estudio de especificidad del método Charm MRL BL/TET con leche de cabra. En él se puede observar la alta especificidad que presenta el método en este tipo de leche tanto para la detección de antibióticos betalactámicos como de tetraciclinas (98% y 100%, respectivamente) según la interpretación realizada por el ROSA Reader (Charm Sciences, Inc.).

La especificidad calculada a partir de la interpretación visual de los de resultados fue ligeramente inferior aunque no llegaron a encontrarse diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ).

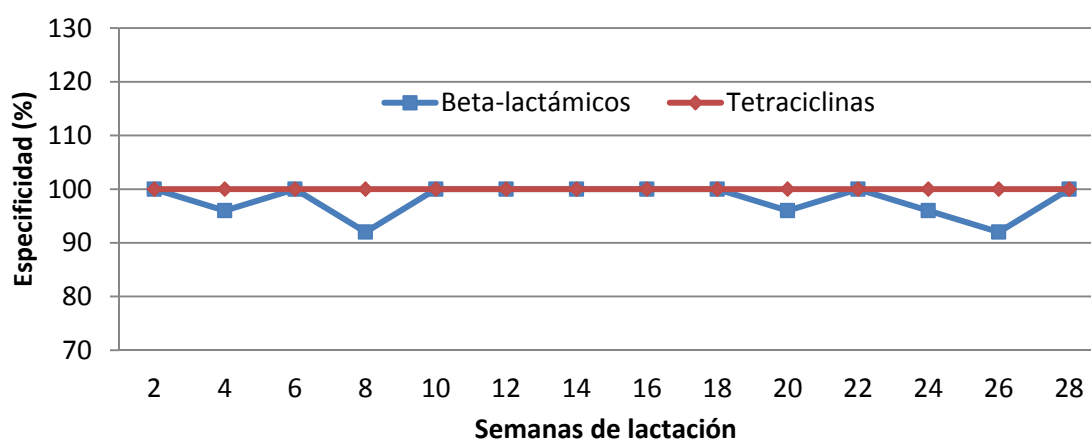
**Cuadro 9.** Resultados obtenidos en el estudio de la especificidad para el método Charm MRL BL/TET

	Betalactámicos						Tetraciclinas					
	Visual			Lector			Visual			Lector		
	P	D	N	P	D	N	P	D	N	P	D	N
Clasificación muestras <sup>(1)</sup>	7	2	341	7	0	343	0	1	349	0	0	350
Negativos/ Totalmuestras	341/350			343/350			349/350			350/350		
Especificidad (%)	97			98			99			100		

<sup>(1)</sup>Clasificación muestras: P=positiva, D=dudosa y N=negativa

Roca y col. (2007) evaluaron el método Charm MRL BL/TET en leche de vaca y obtuvieron una especificidad de 100% para la detección de antibióticos betalactámicos. Sin embargo, Muro (2008), en muestras de leche de oveja, señala una especificidad para este método de 90%, valor muy inferior al encontrado en el presente trabajo. En cuanto a la detección de tetraciclinas, la especificidad calculada por estos autores para la leche de vaca y de oveja, respectivamente, fue ligeramente inferior (99%) a la obtenida en este estudio para la leche de cabra.

En la Figura 10 se representa la evolución de la especificidad del método Charm MLR BL/TET con leche de cabra, a lo largo del período de lactación. En ella se observa que los reducidos resultados “falsos positivos” obtenidos, se encuentran en los dos primeros meses de lactación (semanas 4 y 8) y en los dos últimos (semanas 20, 24 y 26).



**Figura 10.** Evolución de la especificidad del método Charm MLR BL/TET en leche de cabra a lo largo del periodo de lactación

### 1.3. SNAP

La especificidad del método SNAP en tres de sus versiones (SNAP Betalactam, SNAP Tetracycline y SNAP Gentamicin), se determinó empleando muestras individuales de leche de cabra durante todo el periodo de lactación. Las muestras utilizadas para el cálculo de la incidencia de resultados “falsos positivos” en estos métodos de cribado, fueron las mismas que las empleadas en el caso del BetaStar Combo y sus características se recogen en el Cuadro 6.

Los valores de especificidad calculada a partir de las interpretaciones visuales y las lecturas instrumentales del método SNAP Betalactam con leche de cabra se presentan en el Cuadro 10, donde se observa una menor especificidad (93,4%) para las interpretaciones visuales que para las instrumentales (95%), aunque no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en función del tipo de lectura utilizado.

**Cuadro 10.** Resultados obtenidos en el estudio de la especificidad para el método SNAP Betalactam

	SNAP Betalactam				
	Visual			Lector	
	P	D	N	P	N
<b>Clasificación muestras<sup>(1)</sup></b>	18	5	327	18	332
<b>Negativos/Total muestras</b>	327/350			332/350	
<b>Especificidad (%)</b>	93,4			95	

<sup>(1)</sup>Clasificación muestras: P=positiva, D=dudosa y N=negativa

Estos resultados son similares a los obtenidos por Zeng y col. (1998) con muestras de leche de cabra, quienes calculan para este método de cribado, una especificidad de 96.1%. Sin embargo, son muy inferiores a los obtenidos por Contreras y col. (1997) también con leche de cabra (100%) y a los indicados por otros autores en leche de otras especies. Así, Sternesjö y Johnsson (2003) y Borrás (2011) con muestras de leche de vaca, obtienen para el SNAP Betalactam una especificidad de 98% y 100%, respectivamente. Mientras que en muestras de leche de oveja, Berruga y col. (2009) calculan para este método una especificidad de 99%.

Con objeto de determinar las posibles causas de la aparición de este elevado porcentaje de resultados “falsos positivos” en el método SNAP Betalactam con muestras de leche de cabra, se realizó un análisis estadístico de los datos mediante la aplicación de un modelo de regresión logística que considera como factores de variación la semana de lactación, el pH, los componentes mayoritarios de la leche, el recuento de gérmenes totales y el de células somáticas, donde se puede observar que únicamente el RCS tuvo un efecto significativo sobre la incidencia de resultados “falsos positivos” ( $\chi^2 = 8,7503$  y  $p = 0,0031$ )

La ecuación resultante de la aplicación del modelo de regresión logística, que presentó un buen nivel de ajuste, fue la siguiente:

$$L_{ijk} = 8.623 - 2.023[\log RCS]$$

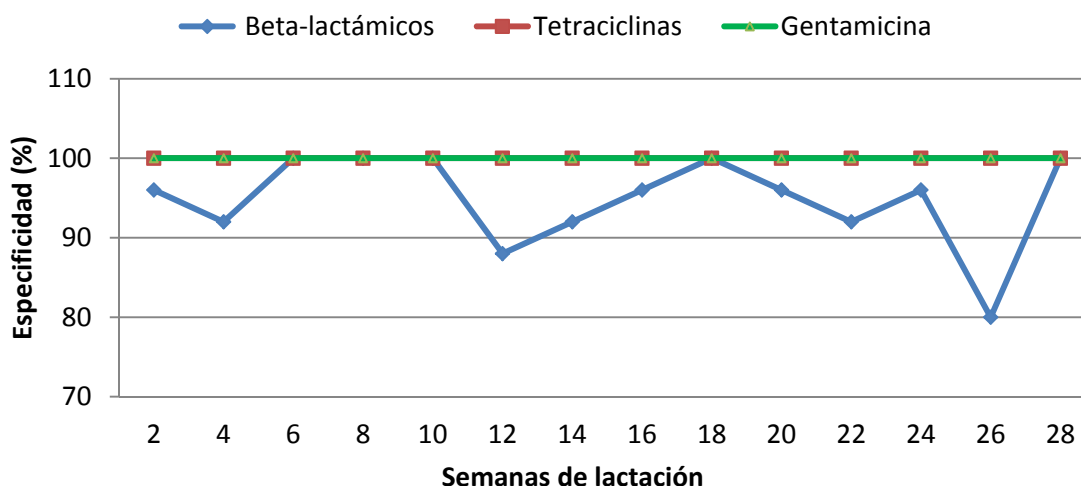
$$(\chi^2 = 1.1795 \text{ y } p = 0,5545)$$

Maron-Carraro y Rodrigues (2000) también observaron un efecto significativo del RCS sobre la respuesta del método SNAP Betalactam en leche de cabra pero, a diferencia de lo indicado por estos autores, las muestras positivas obtenidas en este trabajo ( $n=18$ ) presentaron un menor recuento celular ( $5.50 \pm 0.29$ ) que aquellas que resultaron negativas ( $n=332$ ;  $5.79 \pm 0.42$ ).

En cuanto a la especificidad del método SNAP Tetracycline con muestras de leche de cabra, este parámetro resultó de 100%, con independencia del sistema de lectura empleado ( $p > 0.05$ ). Este valor es superior al obtenido por Berruga y col. (2009) en muestras de leche de oveja que fue de 96%, lo que puede ser debido a las diferencias en la composición de la leche de ambas especies.

Respecto al método SNAP Gentamicin, la especificidad calculada con muestras de leche de cabra también ha sido de 100% no encontrando diferencias significativas ( $p>0.05$ ) con respecto al sistema de lectura utilizado. En este caso no se ha encontrado ninguna referencia bibliográfica con la que poder comparar los resultados obtenidos en este trabajo.

En la Figura 11 se presenta la evolución de la especificidad de las distintas versiones del método SNAP a lo largo del periodo de lactación. En ella se puede ver que el método SNAP Betalactam presenta resultados positivos en gran parte de las semanas de ordeño consideradas, presentando los valores de especificidad más bajos (88%) durante el último mes de la lactación.



**Figura 11.** Evolución de la especificidad del método **SNAP** en leche de cabra a lo largo de la lactación

#### 1.4. Twinsensor<sup>BT</sup>

Las muestras analizadas para evaluar la especificidad del método Twinsensor<sup>BT</sup> con leche de cabra, fueron las mismas que las utilizadas con el método BetaStar Combo (Cuadro 6).

A su vez, el Cuadro 11, presenta los resultados de la especificidad calculada para el método Twinsensor<sup>BT</sup> según los resultados obtenidos con la interpretación visual y la lectura instrumental de las pruebas realizadas.

**Cuadro 11.** Resultados obtenidos en el estudio de la especificidad para el método Twinsensor<sup>BT</sup>

	Betalactámicos						Tetraciclinas					
	Visual			Lector			Visual			Lector		
	P	D	N	P	D	N	P	D	N	P	D	N
<b>Clasificación muestras<sup>(1)</sup></b>	21	19	310	23	24	303	1	0	349	1	0	349
<b>Negativos/Total muestras</b>	310/350			303/350			349/350			349/350		
<b>Especificidad (%)</b>	89			87			99.7			99.7		

<sup>(1)</sup>Clasificación muestras: P=positiva, D=dudosa y N=negativa.



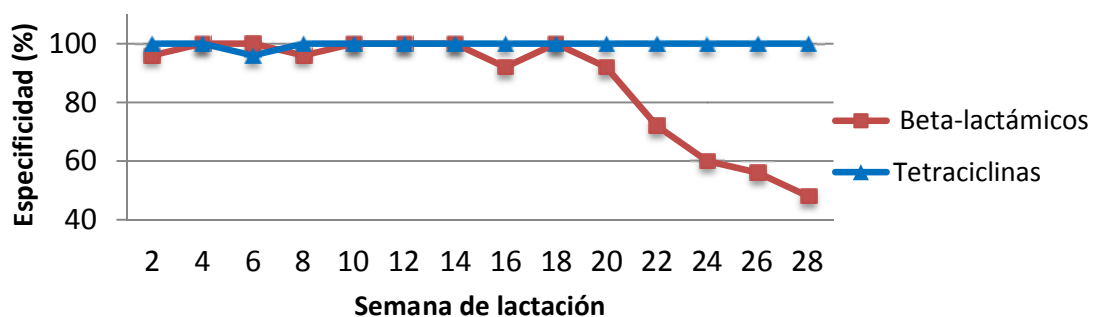
La especificidad calculada para la detección de betalactámicos en el método Twinsensor<sup>BT</sup> según la interpretación visual de los resultados ha sido de 89% ya que se observaron un total de 40 resultados no conformes, de los cuales casi el 50% se corresponden con resultados de dudosa interpretación. Cuando se utilizan los resultados obtenidos mediante la utilización del lector Read Sensor (Unisensor), la especificidad es menor alcanzando un valor de 87%. Al igual que en el caso anterior, la proporción de resultados de dudosa interpretación representa alrededor del 50% de los muestras no conformes obtenidas en este estudio.

Las diferencias observadas no fueron estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ) y podrían estar relacionadas con la diferente percepción de las bandas coloreadas del test por parte del ojo humano y del lector utilizado. Así, 8 de los resultados que fueron interpretados como negativos mediante la lectura visual de las pruebas, fueron clasificados como ligeramente positivos (LPOS) por el lector y 5 de las muestras clasificadas visualmente como dudosas, resultaron positivas para el lector.

En cualquier caso, estos resultados difieren considerablemente de los observados por otros autores en leche de diferentes especies. Así, Berruga y col. (2009) y Muro (2008) en leche de oveja, obtuvieron una especificidad de 95% para la detección de antibióticos betalactámicos mediante el método Twinsensor<sup>BT</sup>. Por su parte, Borrás (2011) obtuvo una especificidad más elevada (98%) en muestras de leche de vaca.

En el caso de la detección de tetraciclinas, la especificidad para este método resulta de 99.7% con independencia del tipo de lectura empleado. Estos resultados son superiores a los obtenidos por Berruga y col. (2009) con leche de oveja y por Borrás (2011) en leche de vaca, que observaron una especificidad de 97 y 98%, respectivamente.

En la Figura 12 se presenta la evolución de la especificidad calculada en base a la interpretación instrumental de resultados del método Twinsensor<sup>BT</sup> a lo largo de la lactación. En ella se observa que la especificidad para la detección de antibióticos betalactámicos en leche de cabra presenta pequeñas fluctuaciones durante los cuatro primeros meses de ordeño para descender de manera muy acusada a partir del quinto mes de lactación, llegando a alcanzar una especificidad de tan sólo un 48% en el momento del secado.



**Figura 12.** Evolución de la especificidad del método Twinsensor<sup>BT</sup> en leche de cabra a lo largo de la lactación

Para evaluar las posibles causas de la elevada incidencia de resultados “falsos positivos” que se producen especialmente en los últimos meses de ordeño, se realizó un análisis estadístico mediante la aplicación de un modelo de regresión logística que considera como factores de variación el estado de la lactación y las diferentes características de la leche estudiadas.

En el Cuadro 12, donde se presentan los resultados del análisis estadístico, se observa el efecto significativo ( $p < 0.05$ ) de la semana de lactación, el pH de la leche y el contenido en proteína bruta, sobre la respuesta del método Twinsensor<sup>BT</sup> para la detección de antibióticos de tipo betalactámico.

**Cuadro 12.** Efecto de las características de la leche sobre la incidencia de resultados “falsos positivos” en el método Twinsensor<sup>BT</sup>

Parámetro	$\chi^2$	p
Semana	94.5474	<0.001
pH	4.4962	0.0340
Proteína	5.0061	0.0253

La ecuación resultante de la aplicación del modelo logístico fue la siguiente:

$$y = 29.866 + 0.329[\text{Semana}] - 5.019[\text{pH}] - 1.071[\text{Proteína}]$$

$$(\chi^2 = 15.225 \text{ y } p = 0,0016)$$

Aunque los resultados del análisis estadístico sugieren que la incidencia de resultados “falsos positivos” en el método Twinsensor<sup>BT</sup> con muestras de leche de cabra, estaría relacionada con el estado de la lactación, el pH de la leche y su contenido en proteína bruta, la ecuación de predicción de resultados “falsos positivos” obtenida, no presenta un adecuado nivel de ajuste con los resultados observados en el laboratorio, lo que indicaría que las diferencias encontradas son estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

## 2. CAPACIDAD DE DETECCIÓN (CC $\beta$ ) DE ANTIBIÓTICOS DE LOS MÉTODOS DE UNIÓN A RECEPTORES PROTEICOS EN LA LECHE DE CABRA

### 2.1 BetaStar Combo

En el Cuadro 13 se presenta la Capacidad de Detección (CC $\beta$ ) del método BetaStar Combo en leche de cabra. Como se puede observar en dicho cuadro, este método permite la detección de todos los antibióticos betalactámicos ensayados a concentraciones inferiores al LMR establecido en la legislación, con excepción de la cefalexina y del ceftiofur que presentaron un valor de CC $\beta$  superior al LMR.

Con respecto a la detección de las tetraciclinas en la leche de cabra, el método BetaStar Combo resultó ser muy sensible a la oxitetraciclina y a la tetraciclina, presentando un valor de CC $\beta$  inferior al LMR para estas sustancias. Sin embargo, la clortetraciclina no fue detectada a ninguna de las concentraciones ensayadas siendo por tanto su CC $\beta$  mayor que el LMR.

En otros estudios llevados a cabo con leche de vaca y con el método BetaStar (Neogen) indicado para la detección rápida de residuos de antibióticos betalactámicos, Zvirauskien y Salomskiene (2007) coinciden con Suhren y col. (2004) en que BetaStar es un buen método para detectar penicilina G, amoxicilina y ampicilina a concentraciones inferiores al LMR.

Más recientemente, Reybroeck y col. (2010) validaron el método BetaStar en leche de vaca siguiendo un procedimiento simplificado de ensayo en el que se reducía el tiempo de incubación de 5 minutos (3+2) a tan sólo dos minutos (1+1) y también observaron resultados similares a los obtenidos en este trabajo. De todos los betalactámicos ensayados, sólo la cefalexina y el ceftiofur presentaron una Capacidad de Detección superior al LMR

**Cuadro 13.** Capacidad de Detección (CC $\beta$ ) del método **BETASTAR COMBO** para antibióticos betalactámicos y tetraciclinas en leche de cabra.

Grupo Antimicrobiano	Nombre del Antibiótico	LMR ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )	Concentración evaluada ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )	Negativas/muestras totales	Resultados Positivos (%)	CC $\beta$ ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )
<b><math>\beta</math>-lactámicos</b>	Amoxicilina	4	2	6/20	70	3
			3	0/40	100	
	Ampicilina	4	2	1/20	95	2
	Cloxacilina	30	15	0/20	100	15
	Penicilina G	4	2	5/20	75	3
			3	0/40	100	
	Cefalexina	100	50	20/20	0	>100
			75	40/40	0	
			100	57/60	5	
	Cefalonium	20	10	0/20	100	10
	Cefapirina	60	30	0/20	100	30
	Cefoperazona	50	25	0/20	100	25
Ceftiofur	100	50	16/20	20	>100	
		75	36/40	10		
		100	52/60	13		
<b>Tetraciclinas</b>	Clortetraciclina	100	50	19/20	5	>100
			75	34/40	15	
			100	21/60	65	
	Oxitetraciclina	100	50	0/20	100	50
	Tetraciclina	100	50	2/20	90	75
75			0/40	100		

## 2.2 Charm MRL BL/TET

El Cuadro 14 resume los resultados del estudio de evaluación de la Capacidad de Detección (CC $\beta$ ) del método Charm MRL BL/TET para algunos antibióticos betalactámicos y otros del grupo de las tetraciclinas, con leche de cabra.

**Cuadro 14.** Capacidad de Detección (CC $\beta$ ) del método **CHARM MRL BL/TET** para antibióticos betalactámicos y tetraciclinas en leche de cabra.

Grupo Antimicrobiano	Nombre del Antibiótico	LMR ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )	Concentración evaluada ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )	Negativas/muestras analizadas	Resultados Positivos (%)	CC $\beta$ ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )
<b><math>\beta</math>-lactámicos</b>	Amoxicilina	4	2	20/20	0	4
			3	12/40	70	
			4	3/60	95	
	Ampicilina	4	2	10/20	50	4
			3	13/40	68	
			4	2/60	97	
	Cloxacilina	30	15	19/20	5	>30
			23	36/40	10	
			30	51/60	15	
	Penicilina G	4	2	0/20	100	2
	Cefalexina	100	50	0/20	100	50
	Cefalonium	20	10	0/20	100	10
Cefapirina	60	30	0/20	100	30	
Cefoperazone	50	25	0/20	100	25	
Ceftiofur	100	50	0/20	100	50	
<b>Tetraciclinas</b>	Clortetraciclina	100	50	4/20	80	75
			75	2/40	95	
	Oxitetraciclina	100	50	0/20	100	50
	Tetraciclina	100	50	1/20	95	50

Como se puede observar en el Cuadro 14, la Capacidad de Detección (CC $\beta$ ) del método Charm MRL BL/TET para los antibióticos betalactámicos, fue inferior al LMR establecido en la legislación para el caso de la penicilina G y las cefalosporinas cefapirina, cefoperazona, ceftiofur y cefalexina, lo que indica una elevada sensibilidad del método para la detección de estas sustancias. En el caso de la amoxicilina, la ampicilina y el cefalonium, el CC $\beta$  calculado resultó igual al valor del LMR. Por el contrario, el método Charm MRL BL/TET, no fue capaz de detectar la cloxacilina a una concentración equivalente al LMR establecido para esta sustancia (CC $\beta$ >30  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ).

En el caso de las tetraciclinas, el método Charm MRL BL/TET detectó la presencia de estas sustancias en la leche de cabra a una concentración inferior al LMR establecido (100  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ), siendo el CC $\beta$  de 75  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  para la clortetraciclina y de 50  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  para la oxitetraciclina y la tetraciclina.

Muro (2008), señala que el método Charm MRL BL/TET en leche de oveja presentó una sensibilidad elevada (90-100%) a antibióticos betalactámicos como ceftiofur, cefalexina y cefoperazona; con respecto a las tetraciclinas fue el método fue 100% sensible a la oxitetraciclina, 87% a tetraciclina y presentó una sensibilidad muy baja (23%) para la clortetraciclina.

Por su parte Roca y col. (2007), en estudios en leche de vaca señaló un 100% de sensibilidad para penicilina G, cefalexina y cefoperazona y en el caso de cloxacilina observó resultados similares a los resultados obtenidos en este trabajo.

En otro método de la misma casa comercial, Charm MRL 3BL, diseñado para la detección rápida de antibióticos betalactámicos en leche, Reybroeck (2011) con muestras de leche de vaca, obtuvo resultados coincidentes con los observados en este estudio a excepción de la cloxacilina, que sí pudo ser detectada a una concentración inferior al LMR establecido.

### 2.3 SNAP (Betalactam, Tetracycline y Gentamicin)

Los resultados obtenidos en la determinación del CC $\beta$  para las tres versiones del método SNAP evaluadas con muestras de leche de cabra, se resumen en el Cuadro 15. El método SNAP Betalactam fue capaz de detectar todos los antibióticos betalactámicos ensayados a concentraciones inferiores al LMR establecido en la legislación.

**Cuadro 15.** Capacidad de Detección (CC $\beta$ ) del método **SNAP** (SNAP Betalactam, SNAP Tetracycline y SNAP Gentamicin) para antibióticos betalactámicos y tetraciclinas en leche de cabra.

Grupo Antimicrobiano	Nombre del Antibiótico	LMR ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )	Concentración evaluada ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )	Negativas/muestras totales	Resultados Positivos (%)	CC $\beta$ ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )
<b><math>\beta</math>-lactámicos</b>	Amoxicilina	4	2	2/20	90	3
			3	1/40	98	
	Ampicilina	4	2	2/20	90	3
			3	0/40	100	
	Cloxacilina	30	15	1/20	95	15
	Penicilina G	4	2	0/20	100	2
	Cefalexina	100	50	19/20	5	75
			75	0/40	100	
	Cefalonium	20	10	20/20	0	15
			15	0/40	100	
Cefapirina	60	30	0/20	100	30	
Cefoperazone	50	25	20/20	0	38	
		38	0/40	100		
Ceftiofur	100	50	0/20	100	50	
<b>Tetraciclinas</b>	Clortetraciclina	100	50	20/20	0	>100
			75	40/40	0	
			100	60/60	0	
Oxitetraciclina	100	50	0/20	100	50	
Tetraciclina	100	50	0/20	100	50	
<b>Aminoglucósidos</b>	Gentamicina	100	50	0/20	100	50

En el caso de los antibióticos del grupo de las tetraciclinas, el método SNAP Tetracycline, presentó un valor de CC $\beta$  por debajo del LMR para el caso de la oxitetraciclina y de la tetraciclina pero no pudo detectar la presencia de clortetraciclina en la leche a una concentración equivalente al LMR (100  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ).

Por último, el SNAP Gentamicin detectó la presencia de gentamicina en la leche de cabra a una concentración equivalente a 0.5x LMR establecido para esa sustancia.

Suhren y col. (1998) realizaron un estudio con muestras de leche de vaca para determinar la sensibilidad del SNAP Betalactam a diferentes sustancias observando que todos los betalactámicos ensayados fueron detectados a una concentración inferior al LMR excepto la amoxicilina, que sólo pudo ser detectada a concentraciones comprendidas entre 1.5 y 2.7 veces el LMR.

Borrás (2011) en leche de vaca indica que el método SNAP Betalactam es muy sensible para sustancias como la cefoperazona y la cefalexina, mientras que para ampicilina y la cloxacilina presentan una sensibilidad muy baja (20% y 40%, respectivamente). A su vez, Muro (2008) en leche de oveja, señala que la sensibilidad de este método es de 100% para el ceftiofur, cefalexina y cefoperazona mientras que presenta una menor sensibilidad para la penicilina y la ampicilina (80% y 53%, respectivamente). En el caso de las tetraciclinas, Muro (2008) indica una sensibilidad de 100% para la oxitetraciclina y de 63% para la clortetraciclina, lo que difiere de los resultados obtenidos en este trabajo.

#### **2.4 Twinsensor<sup>BT</sup>**

En el Cuadro 16 se presentan los resultados del estudio de la Capacidad de Detección (CC $\beta$ ) del método Twinsensor<sup>BT</sup> para algunos antibióticos betalactámicos y tetraciclinas en la leche de cabra.

El método Twinsensor<sup>BT</sup> presenta un valor de CC $\beta$  inferior al LMR para la amoxicilina, ampicilina, cloxacilina, penicilina G, cefalexina, cefalonium, cefapirina y ceftiofur, mientras que el CC $\beta$  para la cefoperazona fue igual al LMR.

En el caso de las tetraciclinas, la oxitetraciclina y la tetraciclina presentaron un CC $\beta$  igual que el LMR establecido para estas sustancias (100  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ). Sin embargo, la clortetraciclina no pudo ser detectada a esta concentración.

Perme y col. (2010) realizó una evaluación del método Twinsensor<sup>BT</sup> con leche de vaca y observó resultados similares a los encontrados en este estudio para todos los antibióticos considerados, es decir, valores de CC $\beta$   $\leq$  LMR, a excepción de la clortetraciclina que fue detectada a una concentración igual al LMR.

Con leche de oveja, Muro (2008) señala una sensibilidad muy elevada para todos los betalactámicos estudiados con el método Twinsensor<sup>BT</sup>, excepto para la cefalexina que presenta valores ligeramente superiores al 50%.

**Cuadro 16.** Capacidad de Detección (CC $\beta$ ) del método **TWINSSENSOR<sup>BT</sup>** para antibióticos betalactámicos y tetraciclinas en leche de cabra

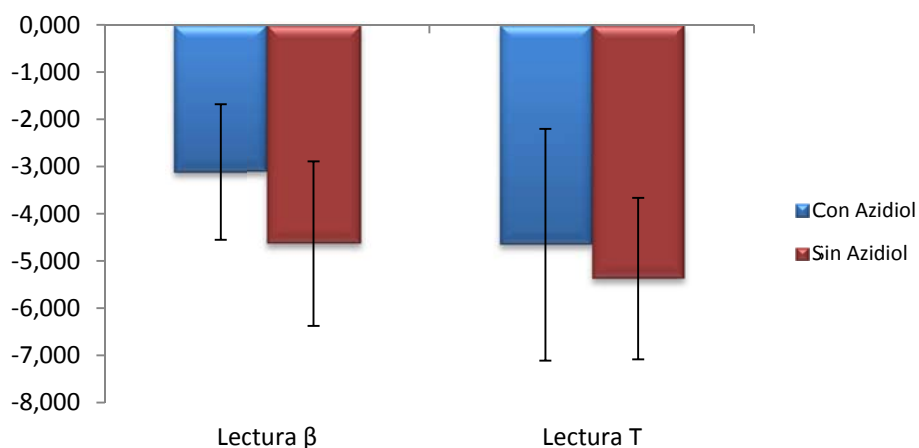
Grupo Antimicrobiano	Nombre del Antibiótico	LMR ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )	Concentración evaluada ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )	Negativas/muestras totales	Resultados Positivos (%)	CC $\beta$ ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )
<b><math>\beta</math>-lactámicos</b>	Amoxicilina	<b>4</b>	2	5/20	75	<b>3</b>
			3	1/40	97,5	
	Ampicilina	<b>4</b>	2	4/20	80	<b>3</b>
			3	0/40	100	
	Cloxacilina	<b>30</b>	15	0/20	100	<b>15</b>
	Penicilina G	<b>4</b>	2	1/20	95	<b>2</b>
	Cefalexina	<b>100</b>	50	3/20	85	<b>75</b>
			75	0/40	100	
	Cefalonium	<b>20</b>	10	0/20	100	<b>10</b>
	Cefapirina	<b>60</b>	30	0/20	100	<b>30</b>
Cefoperazone	<b>50</b>	25	4/20	80	<b>50</b>	
		38	6/40	85		
		50	0/60	100		
Ceftiofur	<b>100</b>	50	0/20	100	<b>50</b>	
<b>Tetraciclinas</b>	Clortetraciclina	<b>100</b>	50	16/20	20	<b>&gt;100</b>
			75	37/40	7,5	
			100	58/60	33	
	Oxitetraciclina	<b>100</b>	50	0/20	100	<b>50</b>
	Tetraciclina	<b>100</b>	50	11/20	45	<b>75</b>
75			0/40	100		

### 3. EFECTO DEL AZIDIOL SOBRE LA RESPUESTA DE LOS MÉTODOS DE UNIÓN A RECEPTORES PROTEICOS EN LECHE DE CABRA

#### 3.1. BetaStar Combo

Los resultados del estudio del efecto del azidiol sobre la respuesta del método BetaStar Combo se interpretaron de manera visual y mediante la utilización del lector AccuScan III (Neogen Corporation) que generó 2 tipos de lecturas: una lectura  $\beta$  para la detección de betalactámicos y una lectura T para la de tetraciclinas. Las lecturas visuales coincidieron con las proporcionadas por el lector.

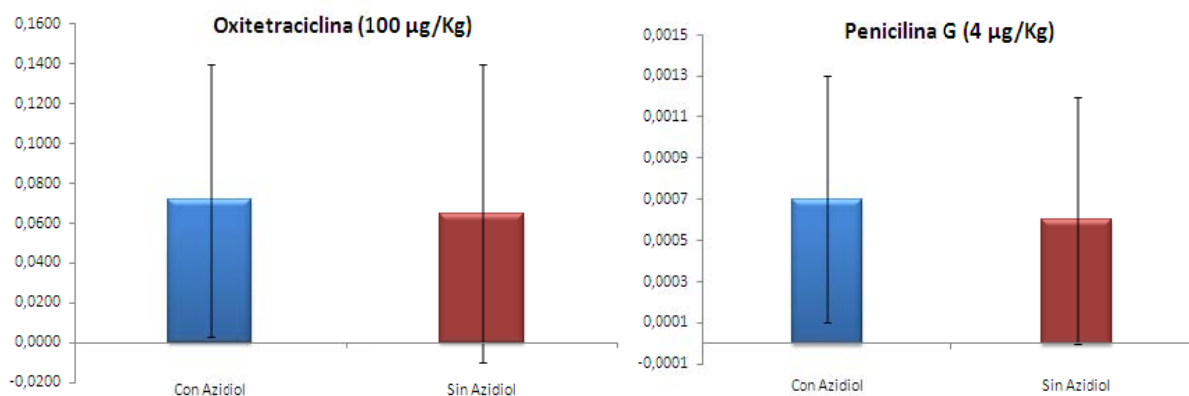
En la Figura 13 se presenta el efecto del azidiol sobre la respuesta del método BetaStar en la leche de cabra sin antibióticos. En ella se observa que tanto la lectura  $\beta$  como la lectura T disminuyen en las muestras de leche adicionadas de azidiol aunque esto no modifica la clasificación de las muestras que resultaron negativas en todos los casos.



**Figura 13.** Efecto del azidol sobre la respuesta del método BetaStar Combo para leche de cabra sin antibióticos

Con respecto a las lecturas obtenidas al adicionar antibióticos a las muestras de leche de cabra (4  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  penicilina G y 100  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  oxitetraciclina), se puede observar (Figura 14) que los valores de las lecturas  $\beta$  y T son superiores en las muestras de leche con conservante aunque en este caso, tampoco se ve afectada la interpretación de los resultados ya que el 100% de las muestras de leche analizadas fueron clasificadas como positivas.

La comparación de los resultados obtenidos en este estudio no ha sido posible ya que no se ha encontrado ningún trabajo que evalúe el efecto del azidol sobre la respuesta de este tipo de métodos de cribado.



**Figura 14.** Lecturas obtenidas en el estudio del azidol en el método BetaStar Combo para leche de cabra con penicilina G y oxitetraciclina

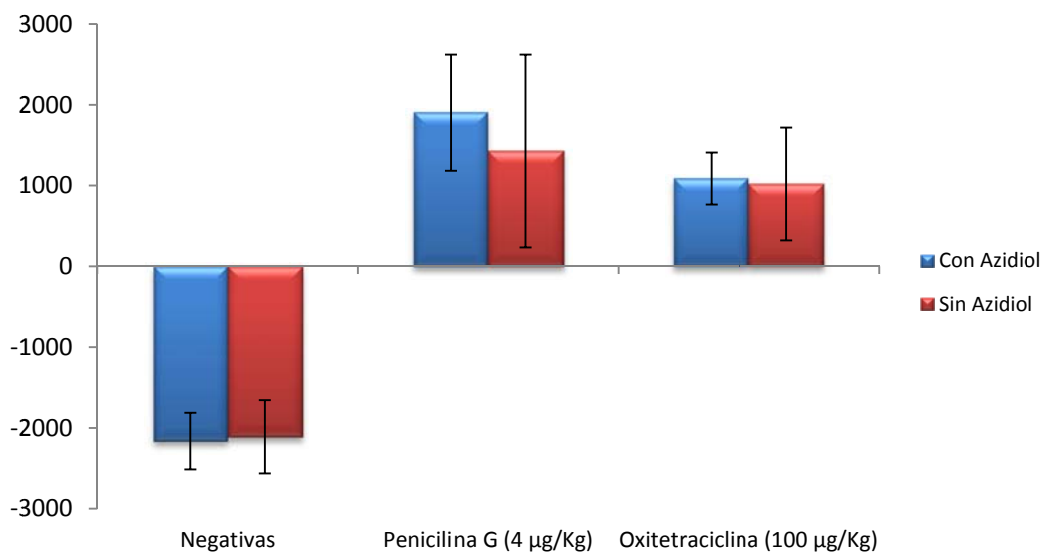
### 3.2 Charm MRL BL/TET

Después de analizar diferentes tipos de muestras de leche de cabra adicionadas o no de conservante con el método Charm MRL BL/TET, se determinó que el azidol no presenta ningún efecto sobre la respuesta de este método rápido de control, ya que todas las muestras libres de



sustancias antibióticas mostraron un resultado negativo con independencia del método de lectura empleado y las adicionadas de antibiótico (pencilina y oxitetraciclina al LMR), fueron interpretadas como positivas tanto visual como instrumentalmente.

En la Figura 15 se representa gráficamente el efecto de la presencia de azidiol sobre la interpretación de los resultados. En ella se observa que la presencia de azidiol incrementa la lectura en las muestras de leche adicionadas de 4  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de pencilina G mientras que en las muestras de leche negativas (sin antibiótico) y en las adicionadas de 100  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de oxitetraciclina apenas se observan diferencias debidas a la presencia del conservante. En cualquier caso, la desviación estándar observada para cada uno de los tipos de leche disminuye considerablemente en las muestras de leche adicionadas de antibiótico.

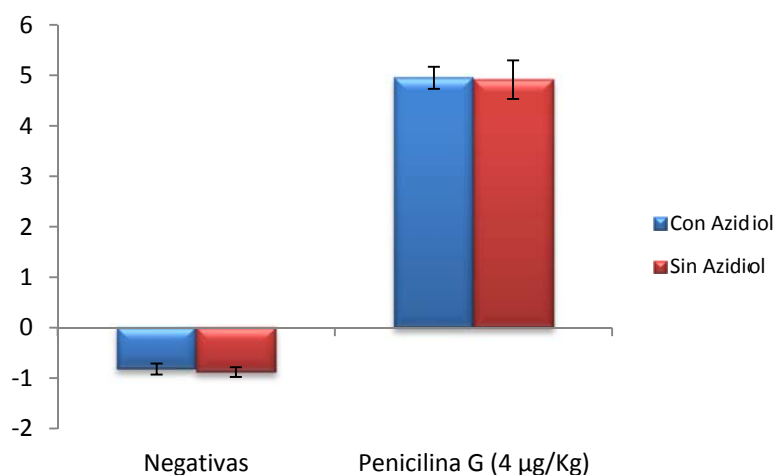


**Figura 15.** Efecto del azidiol sobre la respuesta del método Charm MRL BL/TET para leche de cabra

Actualmente no se ha encontrado ningún estudio que haya evaluado el efecto del conservante sobre la respuesta de este tipo de métodos analíticos por lo no es posible la comparación de los resultados obtenidos en el presente trabajo.

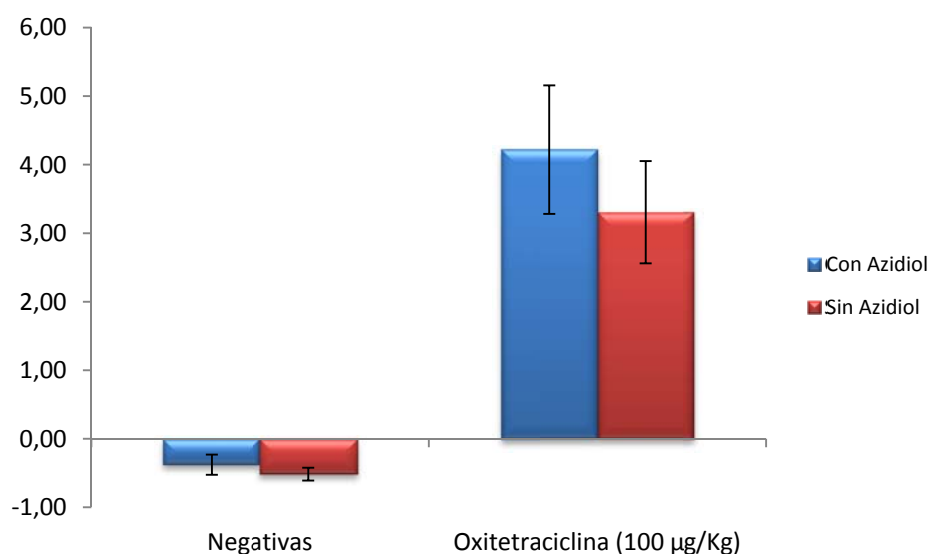
### 3.3 SNAP Betalactam, SNAP Tetracycline y SNAP Gentamicin

La interpretación de resultados del método SNAP Betalactam no se ve afectada por la presencia de conservante en las muestras de leche adicionadas o no de antibiótico (Figura 16), aunque hay que señalar que la presencia del azidiol retarda la aparición de los puntos de lectura, lo que incrementa el tiempo de análisis un promedio de 1.5 minutos respecto al indicado por el fabricante. Además, tanto el punto de muestra como el punto control, presentan una menor intensidad en las muestras de leche adicionadas de conservante.



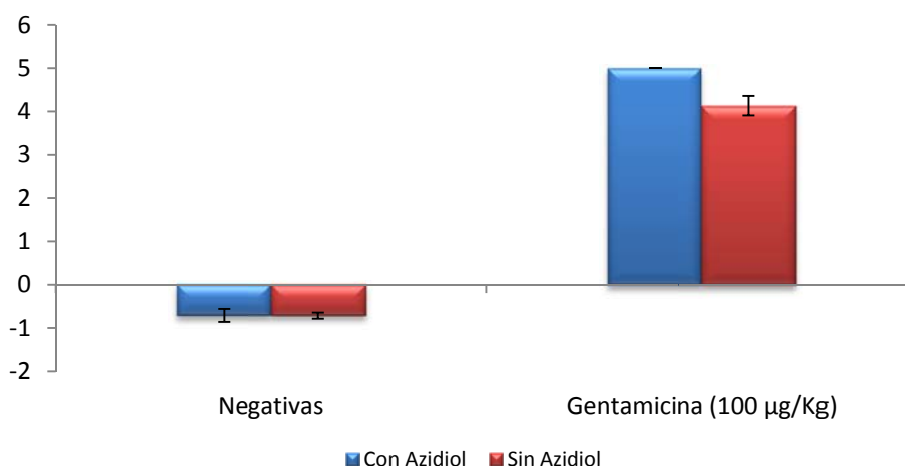
**Figura 16.** Efecto del azidol sobre la respuesta del método **SNAP Betalactam** para leche de cabra sin antibióticos y con penicilina G

En cuanto al SNAP Tetracycline, la presencia de conservante aumentó las lecturas proporcionadas por el lector tanto en las muestras sin antibiótico como en las adicionadas de 100 µg/Kg de oxitetraciclina (Figura 17) aunque esto no afectó la clasificación visual ni instrumental de las muestras de leche.



**Figura 17.** Efecto del azidol sobre la respuesta del método **SNAP Tetracycline** para leche de cabra sin antibióticos y con penicilina G

La presencia de azidol no afectó el comportamiento del método SNAP Gentamicin (Figura 18). Las muestras de leche sin antibiótico permanecieron negativas ante la presencia del conservante y las adicionadas de 100 µg/Kg de gentamicina, fueron clasificadas como positivas, con independencia de que tuvieran o no azidol, tanto visual como instrumentalmente, observando un incremento de las lecturas proporcionadas por el lector en este último caso.



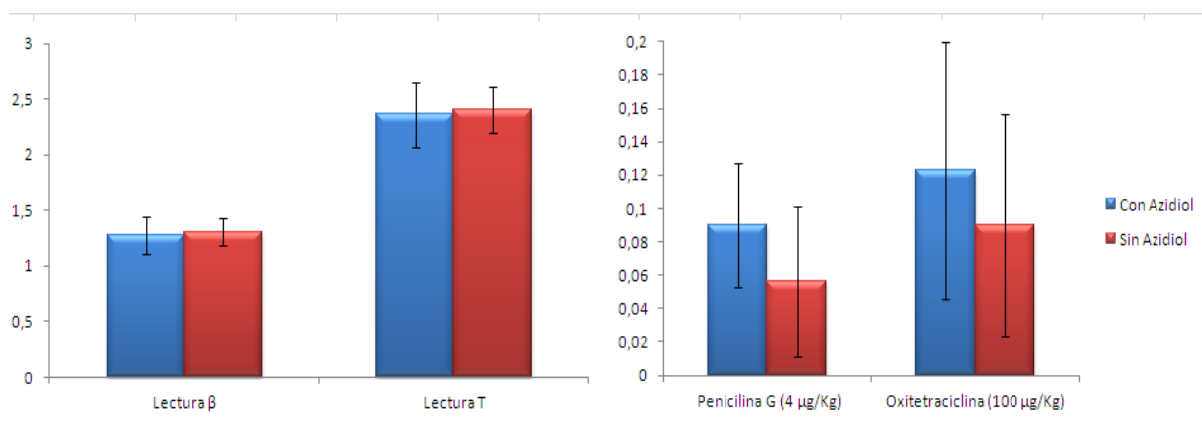
**Figura 18.** Efecto del azidol sobre la respuesta del método **SNAP Gentamicin** para leche de cabra sin antibióticos y con penicilina G

Hay que señalar que tanto para los métodos SNAP Betalactam, SNAP Tetracycline y SNAP Gentamicina, no se han encontrado datos de estudios anteriores que permitan comparar los resultados obtenidos.

### 3.4 Twinsensor BT

En la Figura 19 se representa gráficamente el efecto de la presencia de azidol sobre la interpretación de los resultados en el método Twinsensor<sup>BT</sup>. Al tratarse de un método combinado, el lector generó 2 tipos de lecturas: una lectura  $\beta$  (betalactámicos) y una lectura T (tetraciclinas).

El conservante azidol no tuvo ninguna influencia sobre el resultado del método Twinsensor<sup>BT</sup> ya que todas las muestras de leche de cabra sin antibióticos fueron claramente negativas con independencia del conservante (Figura 19).



**Figura 19.** Lecturas  $\beta$  y T obtenidas en el estudio de azidol del método Twinsensor<sup>BT</sup> en leche de cabra

Respecto a las muestras de leche adicionadas de antibiótico (4 µg/Kg de penicilina G y 100 µg/Kg) tampoco se encuentran diferencias en cuanto a la interpretación de resultados aunque se observa un incremento de las lecturas en las muestras adicionadas de conservante.

Al igual que en los casos anteriores, no se han encontrado trabajos relacionados con este estudio que permitan la comparación de resultados.

# **Conclusiones**

## V. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en este trabajo, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. Los métodos de unión a receptores proteicos, con muestras individuales de leche de cabra, presentan unos elevados porcentajes de especificidad. Para la detección de betalactámicos, el método BetaStar Combo resultó ser el más específico (99%), seguido del Charm MRL BL/TET (98%) y del SNAP Betalactam (95%). Con el Twinsensor<sup>BT</sup> se calculó una especificidad más baja (87%), debido a un elevado número de resultados “falsos positivos”, lo que indica que este método se ve más afectado por las características de la leche de cabra y resulta poco adecuado para el análisis de muestras de leche de cabra individuales.

En el caso de las tetraciclinas, tanto el método Charm MRL BL/TET como el SNAP Tetracycline presentaron una especificidad de 100%, seguidos de Twinsensor<sup>BT</sup> (99,7%) y BetaStar Combo (99%) que también presentaron valores muy elevados, lo que indica que estos métodos son altamente específicos para el análisis de muestras individuales de leche de cabra, es decir, que no presentan interferencias relacionadas con este tipo de leche.

El SNAP Gentamicin también presentó una elevada especificidad (100%) con muestras individuales de leche de cabra.

2. La Capacidad de Detección (CC $\beta$ ) de los métodos de unión a receptores proteicos de los antibióticos betalactámicos y tetraciclinas con respecto al LMR en muestras individuales de leche de cabra, varía según el método y la sustancia antimicrobiana considerada. Para los antibióticos betalactámicos, el SNAP Betalactam y el Twinsensor<sup>BT</sup> mostraron ser capaces de detectar todos los antibióticos analizados a niveles inferiores o iguales al LMR, mientras que el Charm MRL BL/TET no fue capaz de detectar la cloxacilina, y el BetaStar Combo, ni la cefalexina ni el ceftiofur.

Para el grupo de las tetraciclinas, el método Charm MRL BL/TET presentó una Capacidad de Detección (CC $\beta$ ) para todas las sustancias analizadas inferior al LMR, mientras que los métodos SNAP Tetracycline, BetaStar Combo y Twinsensor<sup>BT</sup> no fueron capaces de detectar la clortetraciclina a niveles del LMR.

El SNAP Gentamicin también presentó una Capacidad de Detección inferior al LMR con muestras individuales de leche de cabra adicionadas de gentamicina.

3. El conservante azidol no influyó sobre la respuesta de los métodos de unión a receptores proteicos evaluados (Charm MRL BL/TET, BetaStar Combo, SNAP y Twinsensor<sup>BT</sup>) en muestras individuales de leche de cabra con y sin antibióticos. Sin embargo, en el método SNAP Betalactam se observó que al agregar azidol a las muestras de leche, se retrasaba la aparición de los puntos de lectura lo que obliga a prolongar el tiempo de análisis. Además, la intensidad de dichos puntos es menor en las muestras adicionadas de conservante.

De forma general, se puede concluir que los métodos de unión a receptores proteicos desarrollados para la leche de vaca, se pueden aplicar en la detección de residuos de antibióticos betalactámicos y tetraciclinas en muestras individuales de leche de cabra adicionadas o no de azidol ya que resultaron ser muy específicos y presentaron una buena Capacidad de Detección (CC $\beta$ ) para

los antibióticos analizados con respecto al LMR establecido en la legislación, a excepción del método Twinsensor<sup>BT</sup> que presentó grandes interferencias a nivel de la línea de betalactámicos, a pesar de presentar una buena Capacidad de Detección (CC $\beta$ ). Respecto a la detección de tetraciclinas todos los métodos fueron altamente específicos aunque la Capacidad de Detección (CC $\beta$ ) para la clortetraciclina sólo resultó adecuada en el método Charm MRL BL/TET, aunque hay que indicar que esta tetraciclina es muy poco utilizada en ganado caprino.

Por último, hay que señalar que este trabajo se considera una aportación a la limitada información existente sobre los métodos de detección de antibióticos en la leche de pequeños rumiantes y también un punto de partida para futuros estudios sobre la presencia de residuos antimicrobianos y su detección en ganado caprino.

Actualmente, sería conveniente mejorar la especificidad de algunos de los métodos rápidos a fin de evitar la presencia de resultados “falsos positivos”, así como desarrollar diferentes metodologías que permitan el análisis de otros antimicrobianos diferentes a los betalactámicos y las tetraciclinas que se emplean habitualmente en el ganado caprino lechero y, de este modo, evitar la llegada a la cadena alimenticia de leche de cabra con residuos de antibióticos a fin de proteger al consumidor.

## **Referencias Bibliográficas**



## VI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ACRIMUR (2010). Asociación Española de criadores de la cabra Murciano Granadina. [www.acrimur.es](http://www.acrimur.es)

ALTHAUS R., TORRES A., PERIS C., BELTRÁN M.C., FERNÁNDEZ N., MOLINA M.P. 2003. "Accuracy of BRT® And Delvotest® microbial inhibition tests as affected by composition of ewe's milk". J. Food Prot., 66: 473-478.

ANTHONY F., ACAR J., FRANKLIN A., GUPTA R., NICHOLLS T., YAMURA S., THOMPSON S., THRELFALL E.J., VOSE D., VAN VUUREN M., WHITE D.G. 2001. "Antimicrobial resistance: responsible and prudent use of antimicrobial agents in veterinary medicine". Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz., 20: 829-839.

BELTRÁN, M.C. 2010. "Efecto de la presencia de calostro sobre la respuesta de los métodos de detección de antibióticos en leche de oveja". Tesina de Master. Universitat Politècnica de Valencia. España.

BERRUGA M.I., ROCA M., MOLINA M. P., MOLINA A. 2009. "Evaluation of receptor-based tests for detection of penicillins and tetracyclines residues in ewe milk". IDF World Dairy Summit. Berlín.

BORRÁS, M. 2011. "Evaluación de los métodos de cribado para el control de la presencia de antibióticos en la leche cruda de vaca". Tesis Doctoral. Universitat Politècnica de Valencia. España.

BOZA, J., SANZ, M.R. 1997. "Aspectos nutricionales de la leche de cabra". ACVAO 10: 109-139.

CONTRERAS A., PAAPE M. J., DI CARLO A. L., MILLER R. H., RAINARD P. 1997. "Evaluation of selected antibiotic residue screening tests for milk from individual goats". J. Dairy Sci., 80: 1113-1118.

CRLs. 2010. Guidelines for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines (initial validation and transfer). [www.vri.cz/userfiles/file/hide/EUdocuments/Guidelines\\_2010-01-20.pdf](http://www.vri.cz/userfiles/file/hide/EUdocuments/Guidelines_2010-01-20.pdf)

DECISION 2002/657/CEE del consejo del 12 de agosto de 2002 por la que se aplica la directiva 96/23/CE del consejo en el funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados. Diario oficial nº I, 73: 30-31.

DEMOLY P., ROMANO A. 2005. "Update on beta-lactam allergy diagnosis". Curr. Allergy Asthma Rep., 1: 9-14.

GRUNDWALD L., Petz M. 2003. "Food processing effects on residues: penicillins in milk and yogurt". Anal. Chim. Acta, 483: 73-79.

IDF (International Dairy Federation). 1991. Detection and confirmation of inhibitors in milk and milk products. International IDF Standard nº 258. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica.

LITTERIO, N. J.; BOGGIO, J.C. 2004. "Problemática y control de los antimicrobianos en leche". Publicación periódica de la Universidad Católica de Córdoba. Córdoba. 24 pp.

LUQUET M. 1993. "Leche y productos lácteos: vaca-oveja-cabra". En: Los productos lácteos. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza. España. 540 pp.

MARON-CARRARO C.N., RODRIGUES DA VEIGA D., 2000. "Evaluation of three methods of detecting antibiotic residue in milk". Revista do Instituto de Laticínios Candido Tostes, 54: 77-80.

MITCHELL J.M., GRIFITHS M.W., MC EWEN S.A., MCNAB W.B., YEE A.J. 1998. "Antimicrobial drug residues in milk and meat: causes, concerns, prevalence, regulations, tests, and test performance". J. of Food Prot., 61(6): 742-756.

MOLINA M.P., ALTHAUS R.L., BALASCH S., TORRES A., PERIS C., FERNANDEZ N. 2003. "Evaluation of screening test for detection of antimicrobial residues in ewe milk". J. Dairy Sci., 86: 1947-1952.

MOLINA, M. P.; BERRUGA I., MOLINA, A. 2010. "La presencia de residuos de antibióticos en la leche de oveja: medidas de control y método de elección". Pequeños rumiantes, 11:13-22.

MURO, L. 2008. "Estudio sobre los métodos de unión a receptores proteicos (ROSA<sup>®</sup> Charm, SNAP<sup>®</sup>, Twinsensor) en leche de oveja". Trabajo final de carrera. Universitat Politècnica de Valencia. España.

NAZINA T. N., TOUROVA T. P., POLTARAUS A. B., NOVIKOVA E. V., GRIGORYAN A. A., IVANOVA A. E., LYSENKO A. M., PETRUNYAKA W., OSIPOV G. A., BELYAEV S. S., IVANOV M. V. 2001. "Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *geobacillus subterraneus* gen. nov., sp nov and *geobacillus uzenensis* sp nov from petroleum reservoirs and transfer of *bacillus stearothermophilus*, *bacillus thermocatenulatus*, *bacillus thermoleovorans*, *bacillus kaustophilus*, *bacillus thermoglucosidasius* and *bacillus thermodenitrificans* to *geobacillus* as the new combinations *g-stearothermophilus*, *g-thermocatenulatus*, *g-thermoleovorans*, *g-kaustophilus*, *g-thermoglucosidasius* and *g-thermodenitrificans*". Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 51: 433-446.

O'DONNELL, S. 2007. "The efficacy of antibiotic residue screening tests for the detection of natural antimicrobials in milk". Master's Theses. University of Connecticut Graduate School. USA.

PERME T., MANJA B., KSENIJA G., ANDREJ K. 2010. "Validation of Twinsensor<sup>BT</sup> screening test for the detection of  $\beta$ -lactams and tetracyclines in milk, and comparison to Delvotest<sup>®</sup> SP-NT". Vet Res; 47: 97-106.

QUILES A., HEVIA M<sup>a</sup> L. 1994. "La Leche de Cabra". Editorial Universidad de Murcia. 37p.

REAL DECRETO 1728/2007 de 21 de diciembre, por el que se establece la normativa básica de control que deben cumplir los operadores del sector lácteo y se modifica el Real Decreto 217/2004, de 6 de febrero, por el que se regulan la identificación y registro de los agentes, establecimientos y

contenedores que intervienen en el sector lácteo, y el registro de los movimientos de la leche. BOE, 17 de enero de 2008, nº 15:3508-3519.

REAL DECRETO 217/2004, de 6 de febrero de 2004 por el que se regulan la identificación y registro de los agentes, establecimientos y contenedores que intervienen en el sector lácteo, y el registro de los movimientos de la leche cruda de vaca. BOE, 19 de febrero de 2004, 43: 7802-7806.

REAL DECRETO 752/2011 de 27 de mayo, por el que se establece la normativa básica de control que deben cumplir los agentes del sector de leche cruda de oveja y cabra. BOE, 9 de Junio de 2011, nº 137; 58609-58630.

REGLAMENTO 37/2010/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de diciembre de 2009, relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere a los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal. Diario Oficial nº L 15: 1-72.

REGLAMENTO 470/2009/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 6 de mayo de 2009, por el que se establecen procedimientos para la fijación de los límites de residuos de las sustancias farmacológicamente activas en los alimentos de origen animal, se deroga el Reglamento (CEE) nº 2377/90 del consejo y se modifican las Directiva 2001/82/CE del Parlamento Europeo y del Consejo y el Reglamento (CE) nº 726/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo. Diario Oficial nº L 152: 11-22.

REGLAMENTO 853/2004/CEE del parlamento europeo y del consejo, de 29 de abril de 2004, por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal. Diario oficial nº L 139: 55-205.

REYBROECK S., OOGHE S., DE BRABANDER H.F., DAESELEIRE E. 2010. "Validation of the Beta-s.t.a.r 1+1 for rapid screening of residue of  $\beta$ -lactam antibiotics in milk". Food Addit. Contam. 27: 1084:1095.

REYBROECK S. 2011. "Validation of the Charm MRL-3 for fast screening of B-Lactam antibiotics in raw milk". J. AOAC Int. 94:373-381.

ROCA M., BORRAS M., MOLINA M. P. 2007. "Evaluación de la validez de la determinación-semicuantificación de los residuos de antibióticos en la leche cruda de vaca por los métodos comercializados en España". Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid.

ROCA M., MOLINA M.P., VILLEGAS L., GABIRONDO E., ALTHAUS R.L. 2008. "Effect of cold storage on stability of tetracyclines in milk". Sesión 1 p. 42. International Dairy Federation. World Dairy Summit. Mexico, DF.

SCHIFFMANN A.P., SCHÜTZ M., WIESNER H. 1992. "False negative and positive results in testing for inhibitor substance in Milk. Factors influencing the Brilliant Black Reduction test (BRT®)". *Milchwissenschaft*, 47: 770-772.

SISCHO W. M., BURNS C. M., 1993. "Field trial of four cowside antibiotic residue screening test". *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 202: 1249-1254.

Statgraphics®. Statistical Graphics Corp. Versión 5.1. 1994-2001.

STERNESJÖ A., JOHANSSON G., 2003. "The swedish system for detection and separation of beta-lactam antibiotics contaminated milk-a practical approach". *Milchwissenschaft*, 58: 68-69.

SUHREN G., REICHMUTH J., 1998. "Nachweis von  $\beta$ -laktamantibiotik rückständen in milk-Erfahrungen mit dem Snap-Beta-Laktamtest". *D.M.Z. Milchwissenschaft*, 119: 674-681.

SUHREN, G. KNAPPSTEIN, K. 2004. "Detection of residues of antibiotics in milk of treated cows by screening methods". *Milchwissenschaft*, 59: 656-660.

TRULLOLS E., RUISANCHEZ I., RIUS F.X. 2004. "Validation of qualitative analytical methods". *Trend Anal. Chem.* 23: 137-145.

UNE-EN ISO 2003a. Guía para la descripción normalizada de ensayos de microbios inhibidores. ISO 13969:2003: Asociación Española de Normalización y Certificación. Madrid, España.

UNE-EN ISO 2003b. Directrices para la descripción normalizada de inmunoanálisis o análisis de receptores para la detección de residuos antimicrobianos. ISO 18330:2003. Asociación Española de Normalización y Certificación. Madrid, España.

VERT, I. GARCÍA, R. 2006. "Estudio del efecto del sistema de producción sobre la cantidad y la composición de la leche de cabra". XXXI Jornadas Científicas y X Internacionales de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia (SEOC), 195:197.

ZENG S.S., HART S., ESCOBAR E.N., TESFAI K., 1998. "Validation of antibiotic residue tests for dairy goats". *J. Food Prot.*, 65: 344-349.

ZORRAQUINO M. 1997. "Niveles de residuos de medicamentos veterinarios en leche por debajo de los límites máximos de residuos de la UE". XIV Reunión de técnicos especialistas en control de mastitis y calidad de la leche (G-Temcal), Palma de Mallorca, España.

ZVIRDAUSKIENE R., SALOMSKIENE J., 2006. "An evaluation of different microbial and rapid tests for determining inhibitors in milk". *Food Control*, 18: 541-547.