



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA

MASTER EN PRODUCCIÓN ANIMAL

Efecto de la presencia de calostro sobre la respuesta de los métodos de detección de antibióticos en leche de oveja

Tesis de Master
Valencia, Julio 2010
M^a Carmen Beltrán Martínez

Director:
M^a Pilar Molina Pons

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que han hecho posible la realización de este trabajo.

A mi directora, Pilar Molina Pons, por su confianza y dedicación.

A Rafael Althaus, por su asesoramiento en el tratamiento estadístico de los datos.

A Mila Borràs Borrás, por su apoyo y compañía.

A todos mis compañeros del Departamento de Ciencia Animal, especialmente a los de la Unidad de Producción Animal, por su consideración hacia mí y por el apoyo recibido.

A mi marido y a mis hijos, por su comprensión.

RESUMEN

La legislación española, así como la de otros países, exige que la leche destinada al consumo humano no contenga calostros. Esta restricción se debe principalmente al hecho de que el calostro presenta unas características fisicoquímicas muy diferentes a las de la leche propiamente dicha que repercuten negativamente sobre su calidad higiénica y tecnológica.

La presencia de calostro en la leche puede afectar negativamente la elaboración de determinados productos lácteos derivados como el queso y dificulta las operaciones de limpieza y mantenimiento de los equipos debido a su elevado contenido en proteínas séricas. Estas proteínas, además de reducir los rendimientos, pueden inhibir el crecimiento de los cultivos iniciadores o estárteres empleados en la industria y alterar las características organolépticas de los productos terminados. Además, el incremento de proteínas, especialmente inmunoglobulinas, que supone la adición de calostro a la leche podría estar relacionado en determinadas circunstancias con los resultados “falsos positivos” que se obtienen en los métodos microbiológicos de detección de antibióticos.

Estos métodos, basados en la inhibición del crecimiento microbiano, son ampliamente utilizados en el control rutinario de las muestras de leche, debido a su sencillez, bajo coste y amplio espectro de detección. Sin embargo, al tratarse de métodos inespecíficos, pueden verse afectados por algunos factores como la presencia de inhibidores naturales de la leche, conservantes, detergentes, u otras sustancias capaces de inhibir el crecimiento del microorganismo del método.

El objetivo de este trabajo ha sido estudiar el efecto de la presencia de calostro en la leche de oveja sobre la respuesta de los métodos microbiológicos de detección de inhibidores más utilizados en España. Para ello se plantearon dos estudios: en un primer trabajo se analizan muestras de calostro con diferentes métodos microbiológicos comerciales (BRT[®] AiM, Delvotest[®] SP-NT y Eclipse[®] 100), con objeto de comprobar el comportamiento de estos métodos con este tipo de producto. En un segundo estudio, se analiza leche adicionada de calostro en distintas proporciones, para evaluar las posibles interferencias que la incorporación de calostro a la leche de oveja puede provocar en los distintos métodos de cribado considerados.

Los resultados obtenidos en el primer estudio, demuestran que los métodos microbiológicos de detección de inhibidores en leche presentan un elevado porcentaje de resultados “falsos positivos” cuando se utilizan con muestras de calostro ovino,

especialmente en las obtenidas dentro de las primeras 12 horas después del parto (BRT[®] AiM= 87,5%; Delvotest[®] MCS= 28,2% y Eclipse[®] 100= 100%). La frecuencia de resultados positivos disminuye con el tiempo transcurrido desde el parto en todos los métodos considerados. Sin embargo hay que destacar, que sigue siendo muy elevada hasta las 72 horas postparto (BRT[®] AiM= 36,4%; Delvotest[®] MCS= 27,3% y Eclipse[®] 100= 47,8%).

La aparición de estos elevados porcentajes de resultados positivos o “falsos no conformes” está relacionada con determinadas características fisicoquímicas del calostro ovino, principalmente el pH y el contenido en inmunoglobulina G, cuyo efecto resultó estadísticamente significativo para el caso de los métodos BRT[®] AiM y Delvotest[®] MCS. En el caso del método Eclipse[®] 100, los resultados “no conformes” estuvieron relacionados con el porcentaje de lactosa de las muestras de calostro.

Por otra parte, la incorporación de calostro ovino a la leche de tanque (segundo estudio) puede afectar a la respuesta de los métodos microbiológicos de detección de inhibidores en la leche de oveja aunque su efecto depende del tipo de calostro (horas postparto) y del método considerado. En general, las interferencias debidas a la presencia de calostro se observaron a concentraciones relativamente elevadas en la leche de oveja (5-25%), especialmente con las secreciones calostrales más próximas al parto (0-12 horas). Transcurridas 48 horas postparto, las posibilidades de obtener resultados positivos por la presencia de calostro en la leche disminuyen de manera considerable, ya que con concentraciones del 50% todos los resultados obtenidos fueron negativos independientemente de la edad del calostro y del método considerado.

Desde un punto de vista práctico se puede concluir que los métodos microbiológicos de detección de inhibidores, no resultan adecuados para la detección de residuos de antibióticos de secado en la leche de oveja durante los tres primeros días después del parto, ya que pueden aparecer un elevado porcentaje de resultados positivos o “no conformes” que desaconsejan la realización de esta práctica.

INDICE GENERAL

I.- INTRODUCCIÓN.....	1
1.- Características del calostro ovino.....	1
1.1.- Generalidades	1
1.2.- Características del calostro ovino	1
2.- La calidad de la leche de oveja	4
2.1.- Calidad bioquímica de la leche de oveja.....	4
2.2.- Calidad higiénico-sanitaria de la leche de oveja	5
3.- Control de la presencia de residuos de antibióticos en la leche.....	7
3.1.- Etapas de control.....	7
3.2.- Métodos de detección de inhibidores.....	8
3.3.- Factores que afectan a los métodos de detección de inhibidores	11
II.- OBJETIVOS	14
III.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
1.- Diseño experimental	15
1.1.- Primer estudio	15
1.2.- Segundo estudio.....	16
2.- Obtención y preparación de las muestras	17
3.- Métodos analíticos	17
3.1.- Composición fisicoquímica y calidad higiénica de las muestras.....	17
3.2.- Métodos de detección de inhibidores.....	18
4.- Análisis estadístico.....	18
4.1.- Primer estudio	18
4.2.- Segundo estudio.....	20
IV.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
1.- Primer estudio. Evaluación de la respuesta de los métodos microbiológicos de detección de inhibidores en la leche con muestras de calostro ovino	21
1.1.- Parámetros fisicoquímicos del calostro ovino	21
1.2.- Análisis de calostro ovino mediante métodos microbiológicos de detección de inhibidores en leche.....	23
1.2.1.- Método BRT® AiM.....	23
1.2.2.- Método Delvotest® MCS	26
1.2.3.- Método Eclipse® 100.....	30
2.- Segundo estudio. Efecto de la presencia de calostro en la leche de oveja sobre la respuesta de los métodos microbiológicos de detección de inhibidores	32
2.1.- Características de las muestras de leche de oveja	32

2.2.- Análisis de muestras de leche adicionadas de calostro ovino mediante métodos microbiológicos de detección de inhibidores	34
V.- CONCLUSIONES	38
VI.- BIBLIOGRAFIA	39

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas del calostro ovino	2
Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de la leche de oveja	5
Tabla 3. Parámetros de calidad higiénica en la leche cruda	6
Tabla 4. Interferencias con los métodos de detección de inhibidores en leche	12
Tabla 5. Parámetros fisicoquímicos de las muestras de calostro ovino obtenidas durante las primeras 72 horas postparto.....	21
Tabla 6. Efecto de las horas postparto sobre las características del calostro ovino	22
Tabla 7. Evolución de los parámetros fisicoquímicos del calostro ovino durante las primeras 72 horas postparto	22
Tabla 8. Modelos matemáticos aplicados en el estudio del efecto del tiempo postparto sobre las características fisicoquímicas del calostro ovino.....	23
Tabla 9. Resultados del método BRT [®] AiM con muestras de calostro ovino obtenidas a diferentes horas postparto	25
Tabla 10. Efecto del tiempo transcurrido desde el parto y de las características fisicoquímicas del calostro ovino sobre las respuestas del método BRT [®] AiM	25
Tabla 11. Valores medios de las propiedades fisicoquímicas del calostro ovino según la respuesta del método BRT [®] AiM.....	26
Tabla 12. Resultados del método Delvotest [®] MCS con muestras de calostro ovino obtenidas a diferentes horas postparto	28
Tabla 13. Efecto del tiempo transcurrido desde el parto y de las características fisicoquímicas del calostro ovino sobre las respuestas del método Delvotest [®] MCS.....	28
Tabla 14. Valores medios de las propiedades fisicoquímicas del calostro ovino según la respuesta del método Delvotest [®] MCS	29
Tabla 15. Resultados del método Eclipse [®] 100 con muestras de calostro ovino obtenidas a diferentes horas postparto	30
Tabla 16. Efecto del tiempo transcurrido desde el parto y de las características fisicoquímicas del calostro ovino sobre las respuestas del método Eclipse [®] 100.....	31
Tabla 17. Características fisicoquímicas de las muestras de leche adicionadas de calostro obtenido a diferentes tiempos postparto	33
Tabla 18. Frecuencia de resultados positivos según la concentración y el tipo de calostro añadido a la leche de oveja	34
Tabla 19. Efecto del tipo de calostro y su concentración en la leche de oveja sobre la respuesta de los métodos de detección de inhibidores	35
Tabla 20. Ecuaciones de predicción para los métodos microbiológicos de detección de inhibidores en leche de oveja.....	35

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Composición química del calostro de oveja	2
Figura 2. Composición química de la leche de oveja	5
Figura 3. Clasificación de los métodos de detección de inhibidores en la leche	9
Figura 4. Diseño experimental del primer estudio	15
Figura 5. Diseño experimental del segundo estudio	16
Figura 6. Efecto del tiempo postparto sobre las características fisicoquímicas del calostro ovino	24
Figura 7. Efecto del pH y de la concentración de proteína y de IgG en el calostro ovino sobre la frecuencia de resultados positivos en el método BRT [®] AiM	27
Figura 8. Efecto del pH y de la concentración de IgG del calostro ovino sobre la frecuencia de resultados positivos en el método Delvotest [®] MCS	29
Figura 9. Efecto de la concentración de lactosa en el calostro ovino sobre la frecuencia de resultados positivos en el método Eclipse [®] 100.....	32
Figura 10. Efecto del tipo de calostro y su concentración en la leche de oveja sobre la frecuencia de resultados positivos en los métodos microbiológicos de detección de inhibidores en la leche.....	36
Figura 11. Concentración mínima inhibitoria de calostro ovino (CMI) en métodos microbiológicos de detección de inhibidores en la leche.....	37

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1. Características del calostro ovino

1.1. Generalidades

El Código Alimentario Español (Real Decreto 2484/1967) define la leche natural como *“el producto íntegro, no alterado ni adulterado y sin calostro, del ordeño completo e interrumpido de las hembras mamíferas domésticas sanas y bien alimentadas”* indicando, además, los requisitos mínimos de calidad que deben satisfacer las leches de las distintas especies que se ordeñan para poder ser destinadas al consumo humano.

El calostro constituye la secreción de la glándula mamaria durante los primeros días postparto y tradicionalmente ha sido considerado como un alimento imprescindible para el cordero durante las primeras fases de su vida postnatal, por su capacidad de transmitir al recién nacido una inmunidad de tipo pasivo que le permite hacer frente a posibles infecciones procedentes del medio ambiente que le rodea, además de proporcionar la energía necesaria para la producción de calor y prevenir la hipotermia, contribuyendo así a garantizar su supervivencia (Vihan, 1998; Nowak y Poidron, 2006).

Sin embargo, su presencia en la leche resulta indeseable y como se ha comentado anteriormente la legislación española, así como la de otros muchos países, exige que la leche destinada al consumo humano no contenga calostro. Esta restricción se debe principalmente al hecho de que el calostro presenta unas características fisicoquímicas muy diferentes a las de la leche propiamente dicha que repercuten negativamente sobre su calidad higiénica y su aptitud tecnológica.

Al igual que en otras especies ganaderas, la producción de calostro ovino así como su composición y propiedades fisicoquímicas dependen de varios factores entre los que pueden incluirse la raza, el número y tipo de parto, el tiempo transcurrido desde el parto, la alimentación y las enfermedades (Molina, 1987; Hadjipanayiotou, 1995; Csapo y col., 1998).

1.2. Características del calostro ovino

El calostro ovino se corresponde con un líquido viscoso, amarillento y amargo que presenta unos valores más elevados de acidez, densidad, viscosidad y conductividad eléctrica que la leche propiamente dicha y un similar punto de congelación (Molina, 1987). Los valores medios y los intervalos de variación de algunos de los principales parámetros fisicoquímicos del calostro se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas del calostro ovino

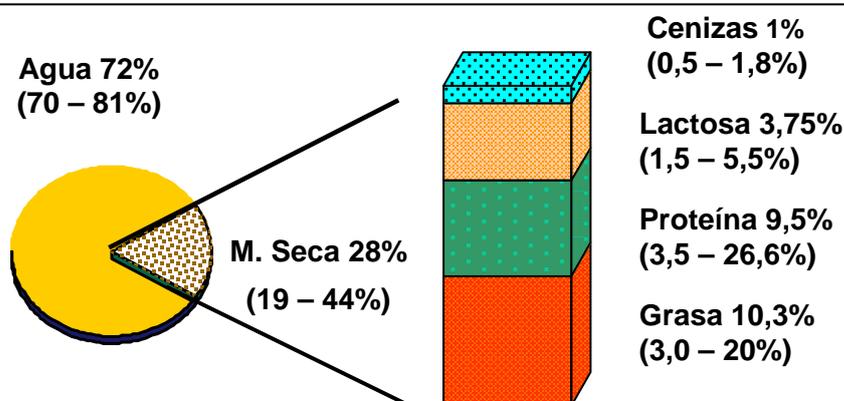
Parámetro	Valor medio	Intervalo variación
Densidad (g/mm)	1,048	1,037 - 1,080
Acidez valorable (° Dornic)	40	16 - 50
pH	6,40	5,1 - 7,1

Fuente: Molina (1987)

A su vez, el calostro como tal, presenta su composición más característica en el momento del parto siendo el resultado de unos procesos de síntesis y permeabilidad celular que tiene lugar en las células de los alvéolos mamarios en las etapas finales del periodo de gestación.

La composición del calostro se va modificando de forma paulatina a medida que los elementos almacenados en la ubre durante la última fase de la gestación van siendo consumidos por la cría y van mezclándose con la nueva secreción de las células glandulares. Los cambios más importantes se producen fundamentalmente en el contenido proteico del calostro que desciende de manera muy intensa durante las primeras 24-48 horas postparto (Molina 1987, Hadjipanayiotou, 1995; Gajdušek y col. 2003). En el resto de componentes los cambios son mucho menos intensos. En general, se produce un descenso de todos los componentes del calostro a medida que avanza la lactación a excepción de la lactosa que aumenta regularmente su concentración durante los primeros días postparto.

A partir de los datos de composición aportados por diferentes autores se ha elaborado la Figura 1 en la que puede apreciarse la importancia relativa de los principales constituyentes del calostro ovino.



Fuente: elaboración propia según distintos autores

Figura 1. Composición química del calostro de oveja.

Uno de los aspectos más destacables en relación con los componentes del calostro es su elevado contenido en proteína, lo que también se refleja en su elevado contenido en materia seca y que está asociado a su riqueza en inmunoglobulinas.

Las inmunoglobulinas constituyen la fracción proteica más importante del calostro desde un punto de vista cualitativo, por su capacidad de transmitir inmunidad al recién nacido. Su concentración en el calostro oscila entre los 60 y los 115 mg/ml (Molina, 1987) siendo la inmunoglobulina G (IgG) la más importante, ya que representa más del 90% del total de inmunoglobulinas (Klobasa y col., 1988; Kolif y El-Loly, 2001).

Este elevado contenido en proteínas séricas hace que la presencia de calostro en la leche pueda afectar negativamente la elaboración de determinados productos lácteos derivados como el queso (Tsioulpas y col., 2007). Estas proteínas, además de provocar la formación de cuajadas más débiles y reducir los rendimientos, pueden inhibir el crecimiento de los cultivos iniciadores o estárteres empleados en la industria y alterar las características organolépticas de los productos terminados.

El efecto del calostro sobre la aptitud tecnológica de la leche depende, en gran medida, de la edad del calostro añadido y de su composición química (Raynal-Lujtac y col., 2005). Así, por ejemplo, la concentración de IgG en el calostro ovino es muy importante durante las primeras horas después del parto pero desciende rápidamente durante los dos primeros días postparto (Csapo y col., 1994).

En general, elevadas concentraciones de IgG se relacionan con una menor estabilidad de la leche a los tratamientos térmicos empleados en la industria (Raynal-Lujtac y col., 2005; Tsioulpas y col. 2007) lo que también puede dificultar las operaciones de limpieza y mantenimiento de los equipos en contacto con la leche.

Por otra parte, el incremento de proteínas, especialmente de inmunoglobulinas, que supone la adición de calostro a la leche podría estar relacionado, en determinadas circunstancias, con los resultados “falsos positivos” que se obtienen con los métodos microbiológicos de detección de antibióticos en leche (Egan y col., 1984; Oliver y col., 1984; Andrew, 2001).

Otro aspecto característico del calostro ovino, que también puede repercutir sobre la calidad higiénica de la leche, es su elevado contenido en células somáticas (Paape y col., 2007), ya que este parámetro ha sido relacionado con un mayor porcentaje de resultados “falsos positivos” en diferentes métodos microbiológicos de detección de inhibidores en leche (Shiffmann y col., 1992; Andrew, 2001; Althaus y col., 2003).

2. La calidad de la leche de oveja

En los últimos años la calidad de la leche ha cobrado una mayor importancia debido a la demanda por parte de la industria de un producto con las características adecuadas para su transformación, así como por una mayor exigencia por parte de los consumidores cada vez más preocupados por la seguridad de los alimentos que consumen. Tampoco hay que olvidar que, con el establecimiento de sistemas de pago por calidad, los ganaderos también están cada día más interesados en obtener un producto con el que conseguir un mayor beneficio económico.

El concepto de calidad de un producto es pues difícil de definir, ya que va a depender de su capacidad para satisfacer las exigencias de su comprador o consumidor. Tradicionalmente se ha venido utilizando como criterio de calidad una valoración de los componentes básicos de la leche (grasa y proteína), considerándose de mayor calidad aquella que contenía un mayor número de nutrientes. Actualmente, la legislación comunitaria realiza una valoración de la calidad de la leche no sólo sobre la base de la composición, sino también, de aquellos elementos indeseables para el producto que, o bien son extraños al mismo (agua añadida e inhibidores) o bien superan los límites admisibles (bacterias y células somáticas). Por tanto, la calidad de la leche cruda de oveja debe analizarse desde dos aspectos: el bioquímico, es decir, características fisicoquímicas y composición química y el higiénico-sanitario.

2.1. Calidad bioquímica de la leche de oveja

Los 330 mil millones de litros de leche de oveja producidos en España se destinan prácticamente en su totalidad a la elaboración de productos lácteos derivados, fundamentalmente quesos (MARM, 2008). 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.

Algunos parámetros fisicoquímicos presentan un especial interés porque son utilizados en la industria láctea para determinar la calidad de la leche (Tabla 2). Así, por ejemplo, el pH y la acidez valorable, expresada en ° Dornic, informan acerca del grado de frescura y sirven como indicadores de la calidad higiénica de la leche mientras que otros, como la densidad y el punto crioscópico, más relacionados con la riqueza en materia seca de la leche, se utilizan para detectar posibles fraudes por adición de agua.

La composición química de la leche tiene una gran importancia porque determina su calidad nutritiva y muchas de sus propiedades. La aptitud tecnológica de la leche cruda depende en gran medida de su composición química, especialmente de su

contenido en grasa y proteína ya que estos parámetros, son los que presentan una mayor relación con el rendimiento queso (Bencini y Pulina, 1997; Pellegrini y col., 1997).

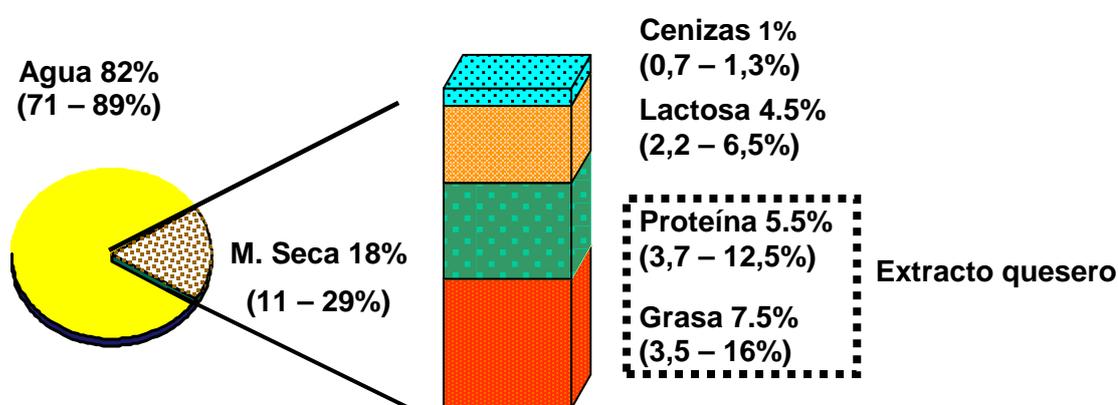
Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de la leche de oveja

Parámetro	Valor medio	Intervalo variación
Densidad (g/mm)	1,036	1,034 – 1,038
Acidez valorable (° Dornic)	22	16 – 25
pH	6,60	6,51 - 6,85
Punto crioscópico (-°C)	0,057	0,570 - 0,590

Fuente: Molina y col. (2009)

La mayor parte de los constituyentes de la leche de oveja varían de forma natural a lo largo de la lactación, viéndose afectados por factores como la raza, el tipo y la época de parto, la edad del animal o la alimentación (Molina y Gallego, 1994) y presentan una marcada estacionalidad al igual que la producción de leche.

En la Figura 2 se presenta la composición química de la leche de oveja según los valores indicados por distintos autores.



Fuente: Elaboración propia según distintos autores

Figura 2. Composición química de la leche de oveja

2.2. Calidad higiénico-sanitaria de la leche de oveja

La legislación europea relativa a la higiene de los alimentos de origen animal destinados a la alimentación humana (Reglamentos CE 852, 853 y 854/2004) 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 (Tabla 3), para que la leche pueda ser comercializada en el ámbito de la Unión europea (UE).

Tabla 3. Parámetros de calidad higiénica en la leche cruda

Parámetro	Vaca	Oveja y cabra	
Recuento gérmenes totales (ufc/ml) ¹	100.000	500.000 ³	1.500.000 ⁴
Recuento células somáticas (cel/ml) ²	400.000		-
Presencia de antibióticos	Ausencia de residuos por encima de los límites de seguridad establecidos en la UE		

¹Media geométrica observada durante un periodo de dos meses con un mínimo de dos determinaciones al mes; ²Media geométrica observada durante un periodo de tres meses con, al menos, una determinación al mes; ³Si el proceso de elaboración de los productos derivados no incluye ningún tratamiento térmico; ⁴Si el proceso de elaboración de los productos derivados incluye tratamiento térmico.

Fuente: Reglamento (CE) 853/2004

A pesar de que no todos los microorganismos que podemos encontrar en la leche cruda tienen la misma implicación sanitaria, la legislación europea utiliza el Recuento de gérmenes totales como parámetro indicador de la higiene durante las operaciones de obtención y conservación de la leche en granja. En el caso de las leches 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.

El Recuento de células somáticas (RCS) es otro de los parámetros utilizados de manera rutinaria para valorar la calidad higiénica de la leche cruda ya que constituye un buen indicador del nivel sanitario de los animales, principalmente en relación a la presencia de mastitis. 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 células por mililitro. En el caso del ganado ovino y caprino la situación no está tan clara y la legislación no ha podido establecer los valores máximos exigibles, dejando la cuestión pendiente de estudio.

Otro de los aspectos considerados en la legislación para valorar la calidad higiénica de la leche cruda es la presencia de residuos de antibióticos. 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 mastitis. Estos tratamientos, constituyen una práctica muy

generalizada que puede ocasionar la contaminación de la leche si no se toman las medidas de protección adecuadas.

Para proteger a los consumidores de la presencia de residuos de medicamentos en los alimentos de origen animal, entre los que se encuentra la leche, la UE ha establecido los Límites Máximos de Residuos (LMR) que se definen en el Reglamento (CE) 470/2009 como “la concentración máxima de un residuo de una sustancia farmacológicamente activa (expresado en $\mu\text{g}/\text{kg}$ o g/kg sobre la base del peso en fresco) que puede permitirse en los alimentos de origen animal”. A su vez, el Reglamento (UE) 37/2010 clasifica las distintas sustancias farmacológicamente activas por lo que al LMR se refiere.

Respecto a los parámetros higiénico-sanitarios, la seguridad de la leche se garantiza, a nivel de la producción primaria, mediante la realización de controles en la explotaciones ganaderas, tanto autocontroles como controles oficiales, así como con la promoción del uso de las “Guías de Prácticas Correctas de Higiene” y las “Guías para la Producción Responsable de Leche Cruda” editadas por el Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino para el ganado vacuno, ovino y caprino de leche.

3. Control de la presencia de residuos de antibióticos en la leche

3.1. Etapas de control

Desde el punto de vista toxicológico, la presencia de residuos de antibióticos en al leche supone un riesgo para el consumidor ya que puede provocar alteraciones de la flora intestinal, reacciones alérgicas o la creación de resistencias microbianas a determinadas sustancias farmacológicas (Demoly y Romano, 2005). Por otra parte, el efecto inhibitor que estas sustancias tienen sobre el crecimiento microbiano hace que su presencia en la leche pueda influir negativamente sobre los procesos de fermentación que requiere la elaboración de determinados productos derivados como el queso y el yogur, deteriorando su calidad y provocando serios problemas a los industriales (Perreten y Teuber, 1995; Packham y col., 2001). Todos estos problemas asociados a la presencia de residuos de antibióticos en la leche han hecho que en los diferentes sistemas de control de la calidad de la leche cruda, se incluyan métodos para su detección.

El control de la presencia de residuos de antibióticos en la leche está regulado a nivel comunitario por la Directiva 96/23/CE, que establece la obligatoriedad de detectar la presencia de residuos de medicamentos veterinarios y otras sustancias como pesticidas, micotoxinas, etc. en todos los productos de origen animal destinados al consumo humano, dentro de un Plan Nacional de Vigilancia de Residuos. Además, en el Reglamento (CE) 853/2004, se especifica claramente que la leche cruda destinada al consumo humano no ha

de presentar residuos de antibióticos por encima de los LMRs establecidos en la legislación, para poder ser comercializada en el ámbito de la Unión europea.

Actualmente, en España, el control de la trazabilidad y calidad es de obligado cumplimiento para la leche cruda de vaca (Real Decreto 217/2004 y Real Decreto 1728/2007). Además, se encuentra en fase de borrador el Proyecto de Real Decreto por el que se establece la normativa básica de control que deben cumplir los agentes del sector de leche cruda de oveja y cabra que se publicará en el año 2010. De este modo y mediante esta nueva legislación se pretende desarrollar la aplicación de los reglamentos europeos relativos a la higiene de los productos alimenticios en el ámbito nacional de la producción de leche cruda de oveja y cabra, estableciendo los controles mínimos obligatorios a realizar por los agentes de estas especies, así como armonizar las condiciones exigibles a los laboratorios de análisis y la actuación homogénea de los mismos ante la toma de muestras, análisis y comunicación a la Autoridad Competente.

Así, al igual que en el vacuno lechero, en la explotación ganadera, antes de cargar la leche cruda en la cisterna de transporte y en el centro lácteo, antes de descargar la leche en los silos de almacenamiento, es obligatorio realizar una verificación de parámetros para comprobar que reúne unas condiciones higiénico-sanitarias adecuadas, como el color, olor, control de la temperatura del tanque y de la cisterna de transporte, comprobación de la limpieza del tanque y si existe sospecha de deterioro microbiológico, realizar la prueba de la acidez. En ambos controles, se recogerán muestras de leche obligatorias que se analizarán en los laboratorios para determinar su calidad comercial (composición) y su calidad higiénico-sanitaria (recuento de gérmenes totales, recuento de células somáticas y presencia de inhibidores).

Además, tanto en los autocontroles como en los controles oficiales, es obligatoria la realización de una prueba de detección de residuos de antibióticos “in situ”, es decir, en la explotación antes de cargar la leche en la cisterna y en el centro lácteo antes de descargar la leche de las cisternas de transporte.

Adicionalmente, en la nueva norma, se extiende al ovino y caprino de leche la obligación establecida en el Real Decreto 1728/2007 de transmitir a la “base de datos Letra Q” los datos generados en la ejecución de los diversos controles.

3.2. Métodos de detección de inhibidores

En el control de la presencia de residuos de antibióticos en la leche se diferencian dos fases que se presentan en la Figura 3. Una primera fase en la que se realiza un control primario 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 LMRs y, también, métodos de confirmación preliminar que son capaces de identificar sustancias o incluso familias de antimicrobianos de una forma más específica.

La segunda fase es de confirmación y cuantificación en 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. Las técnicas cromatográficas son las que se utilizan con mayor frecuencia, siendo la más utilizada la Cromatografía Líquida de Alta Resolución o HPLC.

A su vez, 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 (Figura 3).

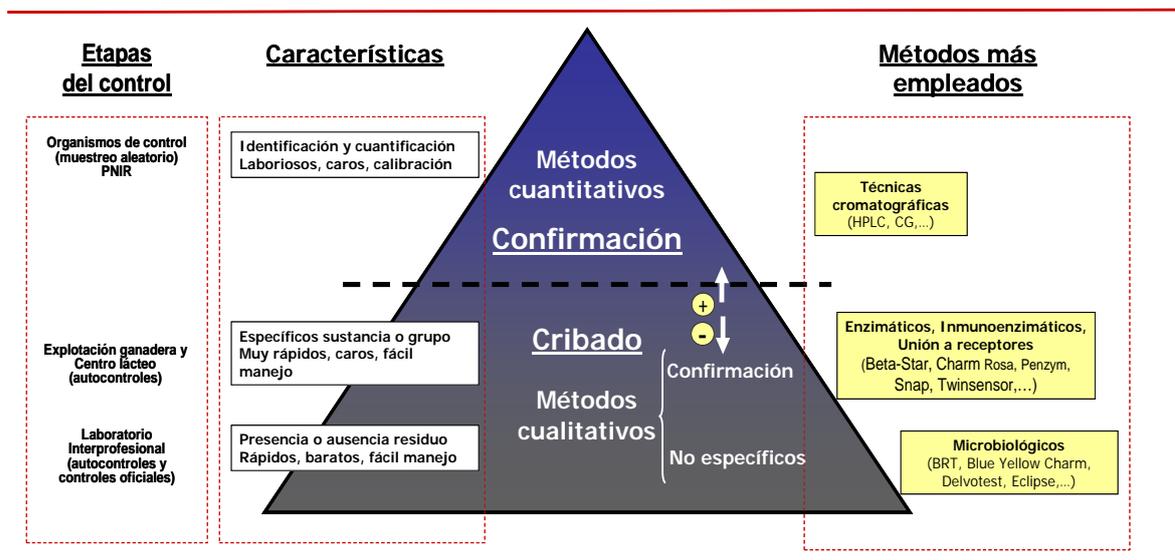


Figura 3. Clasificación de los métodos de detección de inhibidores en la leche

Fuente: Molina y col. (2009)

Los primeros métodos para la detección de residuos de antibióticos en la leche empezaron a utilizarse alrededor de los años 50 (Bishop y White, 1984) y se basaban principalmente en pruebas de inhibición microbiana. Desde entonces, se han mejorado ostensiblemente muchas de las características de estos métodos como la rapidez de respuesta, exactitud, sencillez y sensibilidad, al tiempo que se han desarrollado numerosos métodos basados en técnicas inmunológicas o de receptores proteicos/microbianos que han reducido considerablemente los tiempos de ensayo a escasos minutos. Además, las últimas tecnologías, han integrado las técnicas inmunoenzimáticas con las aplicaciones electrónicas

dando como resultado métodos basados en biosensores de alta especificidad y sensibilidad, que ofrecen un futuro prometedor dentro del campo de la detección de residuos en alimentos.

Los métodos microbiológicos de cribado están basados fundamentalmente en pruebas de inhibición del crecimiento microbiano, empleando para la detección de esta inhibición, diversos sistemas como indicadores de pH, redox, bioluminiscencia, etc. Estos métodos aprovechan fundamentalmente la capacidad de las bacterias para 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 en la actualidad y todos ellos emplean el *Geobacillus steraothermophilus* var. *calidolactis* como microorganismo de prueba.

Por otro lado, entre los métodos de confirmación 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 generalmente, más rápida, la presencia de residuos de antibióticos y sulfonamidas en la leche (Bishop y White, 1984; Mitchell y col., 1998; Botsoglou y Fletouris, 2001; Zorraquino y col., 2003).

Entre los métodos más importantes hay que destacar los basados en técnicas inmunoenzimáticas, ELISA o RIA (Macho, 2003), así como los métodos de unión a receptores proteicos, de gran desarrollo en la actualidad, entre los que destacan el método SNAP[®], Delvo-X-Press[®] βL, Twinsensor^{BT}, Beta Star[®] y ROSA[®] Charm, entre otros.

Como ya se ha comentado anteriormente, en España, el Real Decreto 1728/2007 establece la obligatoriedad de realizar en la leche cruda de vaca pruebas “in situ” de detección de antibióticos en las explotaciones y en los centros lácteos. Además con el proyecto de Real Decreto que se encuentra en fase de publicación, se extiende esta obligación a la leche cruda de oveja y cabra. Desde un punto de vista práctico, es necesario que los métodos utilizados en este tipo de controles ofrezcan un resultado analítico en el menor tiempo posible, lo que permite tomar decisiones rápidas. Por ello, se utilizan métodos enzimáticos o de unión a receptores, que son específicos de una sustancia o grupo de sustancias, muy rápidos (5-10 minutos) y de fácil manejo.

En los laboratorios de control, la legislación establece que para todas las muestras recibidas se utilicen métodos que, al menos, detecten residuos de antibióticos betalactámicos y de tetraciclinas y que, en el caso que se utilice un método sensible a ambos grupos de sustancias y el resultado fuera no conforme, el laboratorio procederá a la identificación del grupo. Estos análisis deben realizarse sobre un elevado número de

muestras y, por ello, se emplean métodos microbiológicos de control que permiten detectar la presencia o ausencia de un residuo por encima de los límites de seguridad establecidos de una manera sencilla, económica, a veces de forma automatizada y en un tiempo relativamente corto (2-3 horas).

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. Para las leches de oveja y cabra se emplean estos mismos métodos sin que se hayan llevado a cabo, en muchos casos, estudios de evaluación para su uso en la leche de estas especies y, en caso necesario, la adaptación u optimización de sus condiciones operativas.

3.3. Factores que afectan a los métodos de detección de inhibidores

Un resultado se considera “falso positivo” o “falso no conforme” cuando una muestra de leche que no contiene residuos de antibióticos u otras sustancias quimioterapéuticas presenta un resultado positivo en un método de detección de inhibidores.

Los métodos microbiológicos de cribado, al tratarse de métodos inespecíficos, pueden verse afectados, en determinadas circunstancias, por algunos factores como el nivel de células somáticas o los inhibidores naturales de la leche (Carlsson y Björck, 1989; Shiffmann y col., 1992; Althaus y col., 2003), la utilización de conservantes (Molina y col., 2003a), detergentes y/o desinfectantes (Žvirauskiene y Salomskiene, 2007) y otras sustancias capaces de inhibir el crecimiento del microorganismo del método.

En la Tabla 4 se encuentran resumidas las posibles interferencias con los métodos microbiológicos de detección de inhibidores en leche que pueden dar lugar a resultados dudosos y positivos, expuestas por Zorraquino (1996).

La obtención de resultados dudosos o “falsos positivos” con los métodos microbiológicos de detección de antibióticos en la leche ha sido atribuida, por numerosos autores, a la presencia de inhibidores naturales tales como lactoperoxidasa, lactoferrina, lisozima, ácidos grasos libres y leucocitos (Carlsson, 1991; Cullor, 1992; Müller y Jones, 1991; Mäyry-Mäkinen, 1993; Zorraquino, 1996; Barbosa, 1997). En ese sentido, las leches calostrales, al igual que las leches mamíferas, han sido relacionadas con el incremento de resultados “falsos positivos” en diferentes métodos microbiológicos de control ya que su elevado contenido en lactoferrina e inmunoglobulinas podría interferir el crecimiento del microorganismo de prueba (Egan y Meaney, 1984; Oliver y col., 1984; Andrew 2001).

Tabla 4. Interferencias con los métodos de detección de inhibidores en leche

Parámetro	
1	Inhibidores naturales: Lisozima Lactoferrina Lactoperoxidasa
2	Lipolisis
3	Reacciones inflamatorias de la ubre Lisozima y lactoferrina Células somáticas
4	Leche anormal final de lactación
5	pH < 6,00
6	Contaminación fúngica del silo
7	Residuos de antiparasitarios
8	Aditivos de piensos (minerales, Cu)
9	Residuos de agentes de limpieza
10	Conservantes adicionados a la leche (azidiol)

Fuente: Zorraquino (1996)

Por otra parte, Brouillet (1994), señala algunas causas que explicarían los resultados erróneos o “falsos positivos”, relacionadas con factores metodológicos como la diferente sensibilidad de los métodos, el calentamiento previo de las muestras de leche antes del análisis, la mala conservación de la leche y los protocolos de realización de los análisis, especialmente los aspectos referentes a la temperatura y tiempo de análisis que, en ocasiones, no son respetados.

Otros autores han estudiado y comparado distintos métodos de detección de inhibidores indicando los porcentajes de “falsos positivos” que aparecen en cada uno ellos. Carlsson y Björck (1989), Cullor (1992), Cullor y col. (1992, 1994) y Tyler y col. (1992) señalaron, en leche de vaca, que la exactitud de los métodos varía mucho cuando se utilizan muestras procedentes de animales individuales, donde se observa un incremento de los resultados “falsos positivos”.

Además, como se ha comentado anteriormente, en el caso de la leche de oveja y cabra, los métodos utilizados para la detección de residuos de antimicrobianos son los mismos que los empleados para la leche de vaca, sin tener en cuenta la diferente composición y características de estos tipos de leches.

Los primeros estudios de adaptación de los métodos de cribado BRT[®], Delvotest[®] y Penzym[®], demostraron que, en muchos casos, no eran adecuados para asegurar la detección de residuos en la leche ovina (Althaus y col, 2001; Althaus y col, 2002; Molina y

col., 2003b), al tiempo que se puso de manifiesto el efecto favorable del calentamiento previo de las muestras de leche, así como una gran interferencia de los conservantes (dicromato potásico y azidiol) que se emplean en la preservación de las muestras durante el transporte hasta el laboratorio de análisis (Althaus y col., 2001; Molina y col., 2003a, Montero y col., 2005). El posible efecto de la composición de la leche sobre los resultados anómalos también ha sido estudiado, observándose una mayor incidencia de resultados positivos en aquellas muestras con recuentos de células somáticas elevados (Althaus y col., 2001).

En cuanto a la evaluación de los métodos denominados “rápidos” (enzimáticos, inmunoenzimáticos, de receptores, etc.), los estudios realizados en leche de oveja (Molina y col., 2002, Roca y col., 2009) señalan, en algunos de ellos un elevado porcentaje de “falsos positivos”, lo que indica la necesidad de adaptar el protocolo de análisis de estos métodos para ser utilizados con leche de oveja.

Por todo ello resulta de gran importancia conocer la influencia de los factores que podrían interferir en la respuesta de estos métodos de control, bien con resultados “falsos positivos” (aspecto negativo para el productor), bien con “falsos negativos” (peligro para la salud del consumidor) para poder establecer un adecuado procedimiento de análisis y/o de interpretación de los resultados. Así, se dispondrá de una mayor información para poder establecer una normativa adecuada para el caso del control de la leche de oveja, 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

El objetivo de este trabajo ha sido estudiar el efecto de la presencia de calostro en la leche de oveja sobre la respuesta de los métodos microbiológicos de detección de inhibidores más utilizados en España.

En un primer estudio se pretende evaluar el comportamiento de diferentes métodos comerciales de cribado cuando se analizan secreciones calostrales en lugar de la matriz para la que fueron diseñados, con objeto de comprobar si este tipo de producto puede interferir con los métodos de control.

Desde un punto de vista práctico, resulta muy difícil que a los laboratorios de control puedan llegar muestras constituidas exclusivamente por calostro, ya que generalmente éstas proceden de la mezcla de la leche de un rebaño constituido por animales que se encuentran en diferentes tiempos del estado de lactación.

Por ello, se planteó un segundo estudio en el que se emplea leche de oveja adicionada de calostro en distintas proporciones con el fin de evaluar las posibles interferencias que la incorporación accidental de esta secreción a la leche, puede provocar en distintos métodos microbiológicos de cribado utilizados rutinariamente en los laboratorios de control.

MATERIALES Y MÉTODOS

III. MATERIALES Y METODOS

1. Diseño Experimental

Para estudiar el efecto del calostro sobre los métodos microbiológicos de detección de antibióticos en leche se plantearon dos estudios. Un primer estudio para evaluar la respuesta de estos métodos cuando se utilizan con muestras de calostro y un segundo estudio para valorar si la presencia de calostro en la leche puede provocar la aparición de resultados “no conformes” en los métodos rutinarios de detección de antibióticos en leche.

1.1. Primer estudio

En el primer estudio se utilizaron 24 ovejas de raza Guirra pertenecientes al rebaño experimental del Instituto de Ciencia y Tecnología Animal (ICTA) de la Universidad Politécnica de Valencia. Los animales no habían recibido ningún medicamento ni se les había realizado tratamiento antibiótico de secado al final de la lactación anterior, para evitar la aparición de residuos de antibióticos en las primeras secreciones postparto.

Las muestras individuales de calostro se obtuvieron durante los tres primeros días después del parto. La primera toma de muestras se realizó dentro de las primeras 12 horas postparto y después a las 24, 36, 48, 60 y 72 horas postparto (Figura 4).

Inmediatamente después de su recogida, las muestras se trasladaban al laboratorio para determinar la acidez, su composición química y el recuento de células somáticas. Seguidamente se analizaron, por triplicado, con tres métodos comerciales de detección de inhibidores en leche, siguiendo las condiciones de ensayo indicadas por el fabricante.

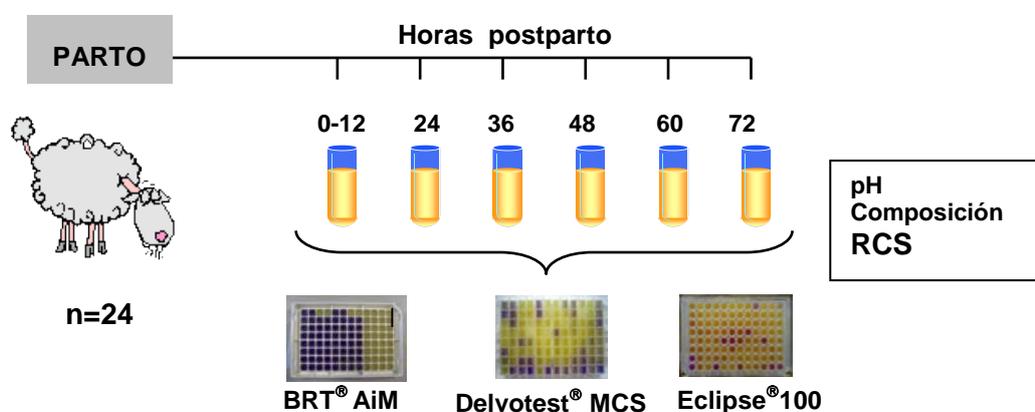


Figura 4. Diseño experimental del primer estudio

1.2. Segundo estudio

En el segundo estudio se utilizó una muestra de leche de mezcla procedente del ordeño regular de ovejas de raza Guirra que se encontraban en el segundo mes de lactación, no tratadas con medicamentos veterinarios en el momento del secado ni durante la realización del experimento.

Tras comprobar que la muestra seleccionada presentaba una calidad de tipo medio para la leche de oveja, se dividió en 3 alícuotas a las que se adicionaron cantidades crecientes de tres tipos de calostro (0-12, 24 y 48 horas postparto) para conseguir 12 concentraciones de ensayo comprendidas entre el 0 y el 50% de calostro en la mezcla. Las muestras de calostro se obtuvieron por mezcla de la secreción de 12 ovejas recién paridas que se ordeñaron durante dos días consecutivos (Figura 5).

Todas las muestras de leche adicionadas de calostro se analizaron mediante los tres métodos microbiológicos de detección de inhibidores utilizados en el control rutinario de las muestras de leche, realizando un total de 12 repeticiones para cada una de las concentraciones de ensayo.

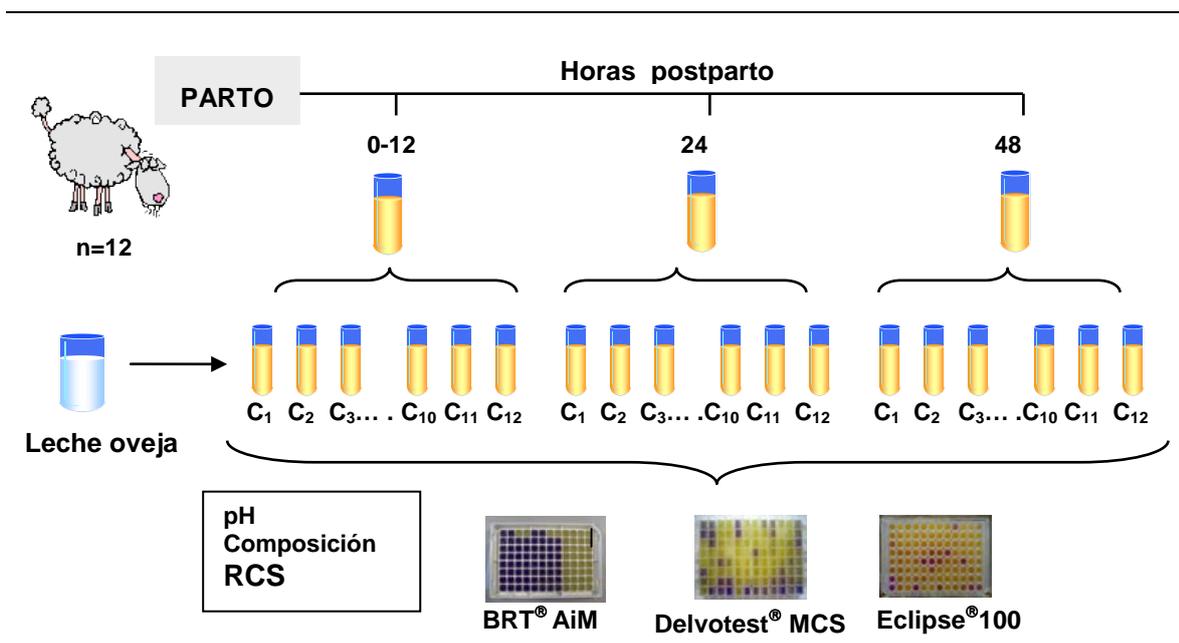


Figura 5. Diseño experimental segundo estudio

A partir de los resultados obtenidos se determinó el nivel de interferencia de los distintos tipos de calostro sobre cada uno de los métodos considerados, a partir del cálculo de la concentración que provocaba la aparición de un 95% de resultados positivos (“no conformes”).

2. Obtención y preparación de las muestras

Las muestras de calostro utilizadas se obtuvieron mediante el ordeño manual de las ovejas. De cada uno de los animales se recogían unos 40 ml de calostro que se colocaban en botes de plástico estériles.

A su vez, la muestra de leche libre de sustancias inhibidoras empleada en el segundo experimento se corresponde con leche de tanque procedente del ordeño mecánico de las ovejas.

Todas las muestras se trasladaban inmediatamente después de su recogida al laboratorio para realizar las determinaciones analíticas correspondientes. Las muestras obtenidas en los controles de la mañana, se analizaban esa misma mañana y las obtenidas en el ordeño de la tarde, a la mañana siguiente. Las muestras se mantuvieron refrigeradas a 4° C hasta el momento de su análisis.

3. Métodos analíticos

3.1. Composición fisicoquímica y calidad higiénica de las muestras

La composición química y el recuento de células somáticas de las muestras de calostro y de leche se realizaron en el Laboratorio Interprofesional Lechero de la Comunidad Valenciana (LICOVAL). Los parámetros analizados para determinar la composición de las muestras de calostro y de leche fueron el contenido en grasa, proteína, lactosa y la materia seca. El análisis de composición se realizó con un equipo automático basado en la espectrofotometría del infrarrojo medio (MilkoScan FT120. Foss, Hillerød. Dinamarca) previamente calibrado para la leche de oveja.

El recuento de células somáticas (RCS) se determinó según el método fluoro-opto-electrónico con la utilización del equipo automático Fossomatic 5000 (Foss. Hillerød. Dinamarca).

También se determinó el contenido en IgG en todas las muestras de calostro utilizadas en el primer experimento así como en la leche adicionada de los distintos tipos de calostro utilizados en el segundo estudio. La cuantificación de IgG en las muestras se llevó a cabo mediante la utilización de un método inmunoenzimático comercial tipo ELISA directo (Goat IgG ELISA Quantitation Set. Bethyl Laboratoires. Montgomery. USA) adaptado para la especie ovina por Rodríguez y col. (2009).

Para la determinación de la acidez se midió el valor del pH con un pH-metro comercial (Crison, Modelo Basic 20⁺. Barcelona. España) calibrado con las soluciones tampón suministradas por el fabricante.

3.2. Métodos de detección de inhibidores

Todas las muestras de calostro utilizadas en el primer experimento se analizaron con tres métodos comerciales para la detección de antibióticos en leche: BRT[®] AiM (Analytik in Milch Produktions-und Vertriebs-GmbH. Munich, Alemania), Delvotest[®] MCS (DSM Food Specialties. Delf, Holanda) y Eclipse[®] 100 (Zeu-Inmunotec. Zaragoza, España) siguiendo las condiciones de ensayo indicadas por cada fabricante.

Estos métodos, basados en la inhibición del crecimiento microbiano, contienen agar con esporas de *Geobacillus stearothermophilus var calidolactis* y un indicador para poder detectar la inhibición del metabolismo del microorganismo de prueba. Los métodos Delvotest[®] MCS y Eclipse[®] 100 utilizan un indicador ácido-base (púrpura de bromocresol) mientras que el método BRT[®] emplea un indicador de oxidación-reducción (negro brillante). En cualquier caso, la ausencia de sustancias inhibidoras en la leche se pone de manifiesto por un cambio en la coloración inicial del medio que pasa de un color azul o púrpura (resultado positivo) a amarillo (resultado negativo).

El procedimiento operativo de los tres métodos utilizados es bastante similar. La prueba consiste en inocular 100 µl de leche en cada uno de los 96 pocillos que conforman la placa e incubar a la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo de prueba (63-65° C) durante un tiempo determinado que, generalmente se encuentra comprendido entre 2 y 3,5 horas. La única diferencia entre los métodos utilizados es que el método Eclipse[®]100 requiere de una fase previa de predifusión de las muestras de 1 hora a temperatura ambiente, seguida del lavado de los pocillos, antes de proceder al periodo de incubación a 65° C.

La lectura de las pruebas se realizó de forma visual por tres personas entrenadas, clasificando los resultados como negativos (“conformes”), dudosos o de difícil clasificación y positivos (“no conformes”).

4. Análisis estadístico

4.1. Primer estudio

Los cálculos de las medias, desviaciones estándar así como los valores máximos y mínimos del pH, de la composición de las muestras de calostro y del recuento de células somáticas se realizaron con el procedimiento Proc Means del paquete estadístico SAS[®] (SAS, 2001). En el caso de las células somáticas se empleó el logaritmo decimal del recuento.

Para estudiar el efecto del tiempo transcurrido desde el parto (horas postparto) sobre las características fisicoquímicas del calostro se realizó un análisis de la varianza mediante el procedimiento Proc Mixed del programa estadístico SAS[®] (SAS, 2001). Se utilizó un modelo de medidas repetidas que considera las horas postparto como factor fijo de repetición y el efecto aleatorio del individuo (oveja). Este modelo fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + HP_i + O_j + \varepsilon_{ijk}$$

Siendo:

Y_{ijk} = Variable dependiente, μ = Media general, HP_i = Horas postparto, O_j = Oveja y ε_{ijk} = error residual.

Con el propósito de establecer una relación entre los principales parámetros fisicoquímicos del calostro de oveja (pH, G, P, IgG, L, ST y logRCS) como una función del tiempo transcurrido desde el parto, se aplicó un modelo de regresión lineal a diversas transformaciones (logarítmica, inversa, cuadrática, inversa cuadrática, inversa de la raíz cuadrada, etc.) de las variables respuestas y de la variable predictiva (horas postparto). Para ello, se utilizó el siguiente modelo estadístico:

$$\text{Trans } [Y]_{ij} = \beta_0 + \beta_1 \text{ Trans } [HP]_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

$\text{Trans } [Y]_{ij}$ = Transformación (logarítmica, inversa, cuadrática, inversa cuadrática, inversa de la raíz cuadrada, etc.) de la variable respuesta (pH, G, P, IgG, L, ST y logRCS), β_0 : Ordenada al origen, β_1 : Pendiente de la recta, $\text{Trasn } [Tpp]_i$: Transformación (logarítmica, inversa, cuadrática, inversa cuadrática, inversa de la raíz cuadrada, etc.) del tiempo transcurrido tras el parto, ε_{ij} : error del modelo.

Este análisis estadístico se realizó mediante el procedimiento Proc Reg del programa estadístico SAS[®] (SAS, 2001). Como parámetro indicador del grado de ajuste alcanzado mediante este modelo, se calculó el coeficiente de regresión cuadrático.

A su vez, para analizar las posibles causas de los resultados “falsos positivos” obtenidos, se realizó un estudio del efecto de las propiedades fisicoquímicas del calostro sobre la respuesta de los métodos de detección de antibióticos utilizados. Los resultados dudosos de difícil clasificación recibieron el mismo tratamiento estadístico que los positivos o “no conformes”.

Teniendo en cuenta que las respuestas de estos métodos son variables categóricas (“positivo” o “negativo”), se utilizó un modelo de regresión logística multinomial para estimar el porcentaje de resultados “falsos positivos” como una función

exponencial de las variables explicativas. El modelo utilizado fue el siguiente:

$$L_i = \text{logit} [P_i] = \beta_0 + \beta_1 [\text{pH}] + \beta_2 [G] + \beta_3 [P] + \beta_4 [\text{lgG}] + \beta_5 [L] + \beta_6 [\text{ST}] + \beta_7 [\text{logRCS}] + \varepsilon_i$$

Donde:

$\text{logit} [P_i]$ = probabilidad de resultados positivo de un método; β_i = coeficientes estimados por el modelo; pH_i = valores de pH, G_i = grasa; P_i = proteína; L_i = lactosa; ST_i = sólidos totales; logRCS_i = logaritmo decimal del recuentos de células somáticas; ε_i = error residual del modelo.

El estudio estadístico se realizó mediante la opción Stepwise del procedimiento Proc Logistic contenido en el paquete SAS[®] (SAS, 2001).

4.2. Segundo estudio

Para determinar la concentración de calostro capaz de interferir en la respuesta de los métodos microbiológicos de detección de antibióticos en leche (nivel de interferencia del calostro) se aplicó el siguiente modelo de regresión logística:

$$L_{ijk} = \text{logit} [P_{ijk}] = \beta_0 + \beta_1 [C_i] + \beta_2 [TC_j] + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

L_{ijk} = Modelo logístico; $[P_{ijk}]$ = probabilidad de respuesta positiva; β_0 = ordenada al origen; β_1, β_2 = coeficientes estimados por el modelo logístico; C_i = efecto de la concentración de calostro; TC_j = efecto del tipo de calostro utilizado, expresado en términos de variables Dummy (Calostro 12 horas: $Z_1=0$ y $Z_2=1$; Calostro 24 horas: $Z_1=1$ y $Z_2=0$; Calostro 48 horas: $Z_1=1$ y $Z_2=1$); ε_{ijk} = error residual

El estudio estadístico se realizó mediante la opción Stepwise del procedimiento Proc Logistic contenido en el paquete SAS[®] (SAS, 2001).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. PRIMER ESTUDIO. Evaluación de la respuesta de los métodos microbiológicos de detección de inhibidores en la leche con muestras de calostro ovino

1.1. Parámetros fisicoquímicos del calostro ovino

En la Tabla 5 se presentan los valores medios de los parámetros fisicoquímicos junto con la desviación estándar y el intervalo de variación, del total de muestras de calostro analizadas en el primer experimento.

Uno de los aspectos característicos del calostro ovino es su mayor acidez con respecto a la leche propiamente dicha, lo que puede también puede observarse en este caso, ya que el pH medio de las muestras analizadas fue de 6,53.

En cuanto a la composición química del calostro, destaca su elevado contenido en nutrientes principales, especialmente proteína, cuyo valor medio fue de 10,48% con un intervalo de variación comprendido entre 4,33 y 31,4%. Este hecho estaría en parte justificado por su mayor concentración en inmunoglobulina G (IgG) que llegó a alcanzar valores superiores a los 70 mg/ml siendo su valor medio de 21,13 mg/ml.

Por otra parte, el recuento de células somáticas (RCS) de las muestras de calostro fue bastante elevado, con un valor medio de 1.816×10^3 cel/ml.

Finalmente, cabe comentar que todos los resultados obtenidos para los distintos parámetros fisicoquímicos estudiados se encuentran dentro del rango descrito para este tipo de producto en el apartado de la Introducción, donde también se representa gráficamente (Figura 1) la importancia relativa de los principales componentes del calostro.

Tabla 5. Parámetros fisicoquímicos de las muestras de calostro ovino obtenidas durante las primeras 72 horas postparto (n=136)

Parámetro	Media	DS	Mínimo	Máximo
pH	6,53	0,23	6,07	7,47
Grasa (%)	9,43	3,88	3,03	26,01
Proteína (%)	10,48	6,16	4,33	31,14
Inmunoglobulina G (mg/ml)	21,13	18,95	1,41	71,08
Lactosa (%)	3,54	1,22	1,05	5,23
Sólidos Totales (%)	24,41	7,48	11,01	46,65
RCS ($\times 10^3$ cel/ml)	1.816	-	33	36.663
Log RCS	5,63	0,66	4,52	7,56

RCS: Recuento de Células Somáticas; Log RCS: Logaritmo del Recuento de Células Somáticas

Tal como se ha señalado en la revisión bibliográfica, la composición y las características fisicoquímicas del calostro van modificándose progresivamente a medida que los elementos almacenados en la ubre durante la última fase de la gestación son consumidos por la cría y se mezclan con la nueva secreción de las células glandulares. Este hecho explicaría el amplio intervalo de variación que se observa en la práctica totalidad de parámetros estudiados, durante las primeras 72 horas postparto.

En la Tabla 6, donde se presentan los resultados del análisis de la varianza de las características fisicoquímicas del calostro, puede observarse el efecto altamente significativo ($p < 0,001$) del tiempo transcurrido desde el parto sobre la mayor parte de las variables estudiadas.

Tabla 6. Efecto de las horas postparto sobre las características del calostro ovino

Parámetro	Valor "F"	Valor "p"
pH	31,11	<0,0001
Grasa	4,36	0,0013
Proteínas	13,57	<0,0001
Inmunoglobulina G	15,46	<0,0001
Lactosa	93,21	<0,0001
Sólidos Totales	8,69	0,0002
Log RCS	3,86	0,0031

Log RCS: Logaritmo del recuento de células somáticas

A su vez, en la Tabla 7 se presentan las características medias del calostro en función del tiempo transcurrido desde el parto. En ella puede apreciarse que el calostro presenta su composición más característica dentro de las primeras 12 horas postparto y que después de 48 horas, las diferencias dejan de ser estadísticamente significativas lo que indicaría que estaríamos ante la transición de calostro a leche propiamente dicha.

Tabla 7. Evolución de los parámetros fisicoquímicos del calostro ovino durante las primeras 72 horas postparto

Parámetro	Horas postparto					
	12	24	36	48	60	72
pH	6,36 ^a	6,42 ^a	6,52 ^b	6,60 ^{bc}	6,67 ^c	6,64 ^c
Grasa (%)	10,28 ^a	11,30 ^a	10,16 ^a	8,97 ^{ab}	8,13 ^b	8,12 ^b
Proteínas (%)	17,11 ^a	14,26 ^b	9,89 ^c	8,01 ^{cd}	7,28 ^d	6,26 ^d
Inmunoglobulina G (mg/ml)	44,66 ^a	34,39 ^b	20,37 ^c	13,97 ^{cd}	10,09 ^d	10,44 ^d
Lactosa (%)	1,94 ^a	2,95 ^b	3,76 ^c	4,09 ^d	4,16 ^d	4,28 ^d
Sólidos Totales (%)	30,44 ^a	29,53 ^a	24,74 ^b	22,00 ^{bc}	20,46 ^c	19,55 ^c
Log RCS	5,93 ^a	5,75 ^{ab}	5,50 ^c	5,56 ^{bc}	5,64 ^{bc}	5,51 ^c

a, b, c, d: letras distintas en una misma fila implican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Estos resultados son similares a los aportados por otros autores como Vijil y col. (1986) y Molina (1987) en razas ovinas españolas, quienes señalan que la transición de calostro a leche propiamente dicha se produciría entre el segundo y el tercer día después del parto.

Para estudiar la relación existente entre los parámetros fisicoquímicos del calostro ovino y el tiempo transcurrido desde el parto se han calculado diversos modelos matemáticos que se presentan en la Tabla 8. A partir de estas ecuaciones, que presentaron en todos los casos un elevado coeficiente de regresión ($R > 0,91$), se han elaborado las curvas de evolución que se presentan en la Figura 6.

Tabla 8. Modelos matemáticos aplicados en el estudio del efecto del tiempo postparto sobre las características del calostro ovino

Parámetro	Modelo matemático	R
pH	$= 1/[0,1625 - 0,00150 (\text{Hora})^{1/2}]$	0,9686
Grasa	$= 1/[0,0918 + 0,0000069 (\text{Hora})^2]$	0,9236
Proteínas	$= 1/(0,0355 + 0,00174 \text{ Hora})$	0,9932
Inmunoglobulina G	$= 97,8827 - 21,0984 \text{ Ln} (\text{Hora})$	0,9842
Lactosa	$= 1/(0,1638 + 4,2138/\text{Hora})$	0,9962
Sólidos Totales	$= 1/(0,0279 + 0,00033 \text{ Hora})$	0,9848
Log RCS	$= [29,6021 + 67,2202/\text{Hora}]^{1/2}$	0,9163

1.2. Análisis de calostro ovino mediante métodos microbiológicos de detección de inhibidores en leche.

1.2.1. Método BRT[®] AiM

Los resultados obtenidos con el método BRT[®] AiM se presentan en la Tabla 9, donde se recogen las frecuencias de resultados negativos, dudosos y positivos para las muestras de calostro obtenidas a diferentes horas postparto. Como puede observarse, el porcentaje de resultados negativos es inicialmente muy bajo (12,5%) aunque se incrementa considerablemente a medida que transcurre el tiempo, alcanzando a las 72 horas postparto un valor de 63,7%. En consecuencia, el porcentaje de resultados que podrían clasificarse como “no conformes”, resulta muy elevado y bastante persistente ya que a las 72 horas postparto todavía representa el 36,4%.

Estos resultados difieren mucho de los obtenidos por Althaus y col. (2003) quienes al estudiar la “Selectividad” (porcentaje de resultados negativos respecto del total de muestras analizadas) del método BRT[®] AiM con muestras de leche de oveja encontraron un porcentaje de resultados “falsos positivos” de 3,75% aunque hay que tener en cuenta que estos autores, empleaban muestras de leche y no secreciones calostrales.

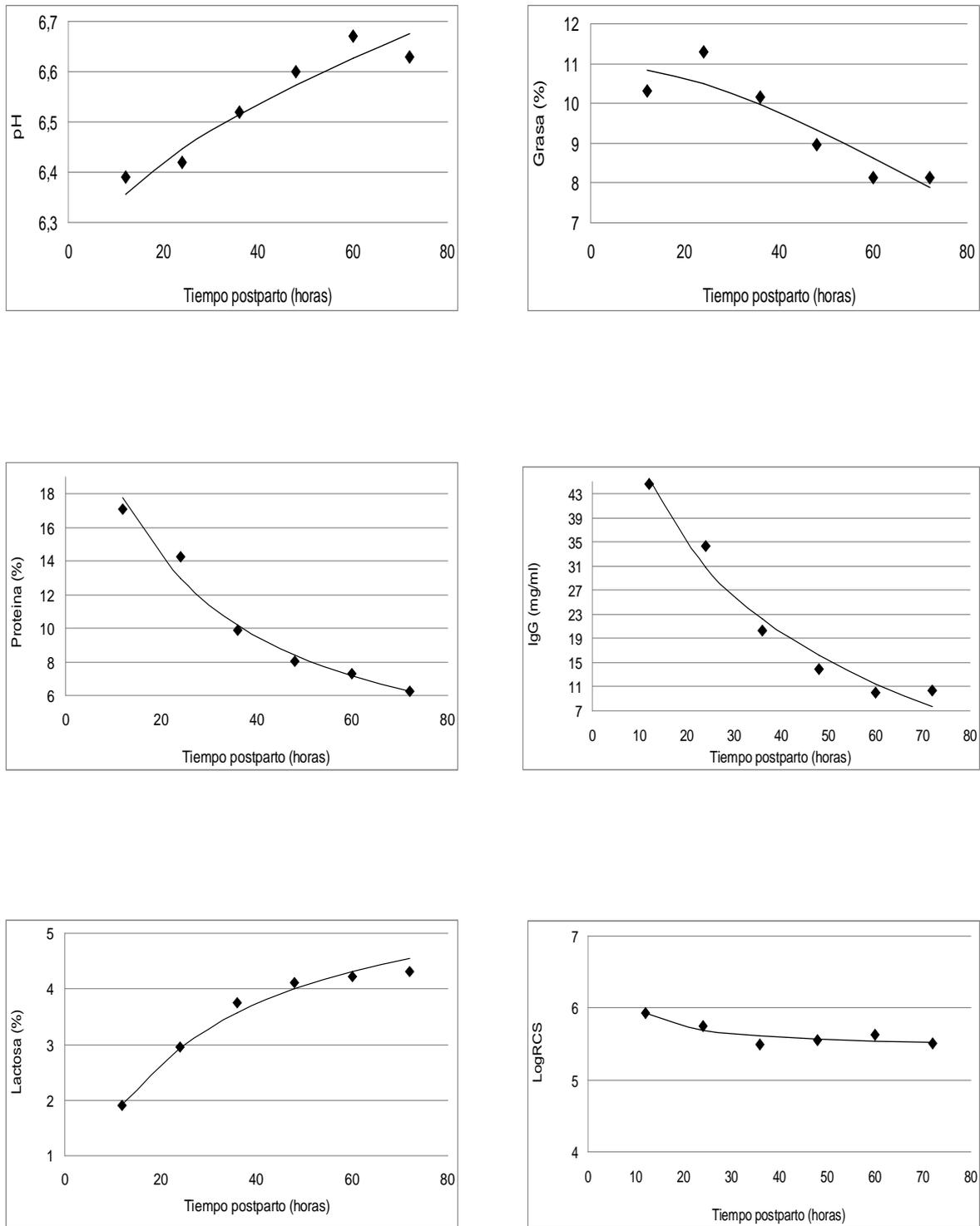


Figura 6. Efecto del tiempo postparto sobre las características fisicoquímicas del calostro ovino

Tabla 9. Resultados del método BRT[®] AiM con muestras de calostro ovino obtenidas a diferentes horas postparto

Método	Horas postparto	Frecuencia Resultados (%)		
		Negativos	Dudosos	Positivos
BRT [®] AiM	0-12	12,5	62,5	25
	24	45,8	33,4	20,8
	36	66,7	12,5	20,8
	48	66,6	16,7	16,7
	60	62,5	25	12,5
	72	63,7	18,2	18,2

n= 24 muestras en cada control

Para estudiar las posibles causas de la aparición del elevado porcentaje de resultados “falsos positivos” en el BRT[®] AiM, se realizó un tratamiento estadístico de los datos mediante la aplicación de un modelo de regresión logística que considera como factores de variación las horas postparto y las características fisicoquímicas del calostro. Es importante señalar que sólo se consideraron dos niveles de respuesta (“conforme” y “no conforme”) y que los resultados clasificados como dudosos, recibieron el mismo tratamiento que los positivos o “no conformes”.

En la Tabla 6 se presentan los resultados del análisis estadístico y se observa el efecto significativo ($p < 0,001$) del valor del pH de las muestras de calostro así como de su contenido en proteína bruta y en IgG, sobre las respuestas del método BRT[®] AiM, no encontrándose diferencias significativas en el resto de parámetros estudiados.

Tabla 10. Efecto del tiempo transcurrido desde el parto y de las características fisicoquímicas del calostro ovino sobre las respuestas del método BRT[®] AiM

Propiedad	Valor “ χ^2 ”	Valor “p”
Hora	0,6484	0,4207
pH	11,6625	0,0006
Grasa	0,3484	0,5550
Proteínas	15,3401	0,0001
Inmunoglobulina G	10,6355	0,0011
Lactosa	0,6209	0,4307
Sólidos totales	0,3259	0,5681
Log RCS	0,1957	0,6582

Para profundizar en el estudio de los factores relacionados con la obtención de resultados “falsos positivos” se calcularon los valores medios de estos parámetros (pH, Proteína e IgG) en función del tipo de resultado obtenido (Tabla 11). Así, las muestras que resultaron positivas al método BRT[®] AiM presentaron por término medio, una mayor concentración de proteína y de IgG que las que fueron negativas, así como un mayor valor de pH aunque en este último caso, la variación encontrada fue muy pequeña.

Tabla 11. Valores medios de las propiedades fisicoquímicas del calostro ovino según la respuesta del método BRT[®] AiM

Propiedad	Respuesta del método BRT [®] AiM	
	Negativo (n=74)	Positivo (n=62)
pH	6,52 ± 0,16	6,54 ± 0,28
Proteína	7,66 ± 3,15	13,84 ± 7,13
Inmunoglobulina G	11,86 ± 12,26	31,32 ± 20,01

La ecuación resultante de la aplicación del modelo de regresión logística fue la siguiente:

$$L = \text{logit} [P(+)/P(-)] = -32,1517 + 4,3478 \text{ pH} + 0,25142 [P] + 0,05719 [\text{IgG}]$$

$$(\chi^2 = 4,5756 \text{ y } p = 0,1015)$$

Esta ecuación de predicción de resultados “falsos positivos” para el método BRT[®] AiM presentó un adecuado nivel de ajuste con los resultados observados en el laboratorio ($p \geq 0,1$), lo que indicaría que las diferencias encontradas no son estadísticamente significativas. A partir de esta expresión, se calcularon las superficies dosis-respuesta que se presentan en la Figura 7.

En esta Figura se aprecia claramente, el incremento de la superficie correspondiente a los resultados considerados como “no conformes”, a medida que aumenta la concentración de proteína y de IgG en las muestras de calostro. Este hecho se hace más evidente cuanto mayor es el pH de las muestras de calostro.

1.2.2. Método Delvotest[®] MCS

En cuanto al método Delvotest[®] MCS, las frecuencias de resultados negativos, dudosos y positivos para los distintos tipos de calostro considerados se presentan en la Tabla 12. En este método, el porcentaje de resultados negativos observado es inicialmente de 70%, valor muy superior al encontrado para el caso del BRT[®] AiM en muestras de calostro obtenidas en las primeras 12 horas postparto. Sin embargo, al final del periodo experimental (72 horas postparto) el porcentaje de muestras clasificadas como “no conformes” representa un valor de 27,3%, ya que las muestras dudosas y positivas, aún representan el 18,2% y el 9,1%, respectivamente.

En la Tabla 13 se presentan los resultados del análisis estadístico realizado para estudiar las posibles causas de los elevados porcentajes de resultados “no conformes” en el método Delvotest[®] MCS. En este caso, también se observó un efecto significativo ($p < 0,001$) del valor del pH de las muestras de calostro así como de su contenido en IgG pero a diferencia del método BRT[®] AiM, el contenido en proteína no presentó diferencias significativas.

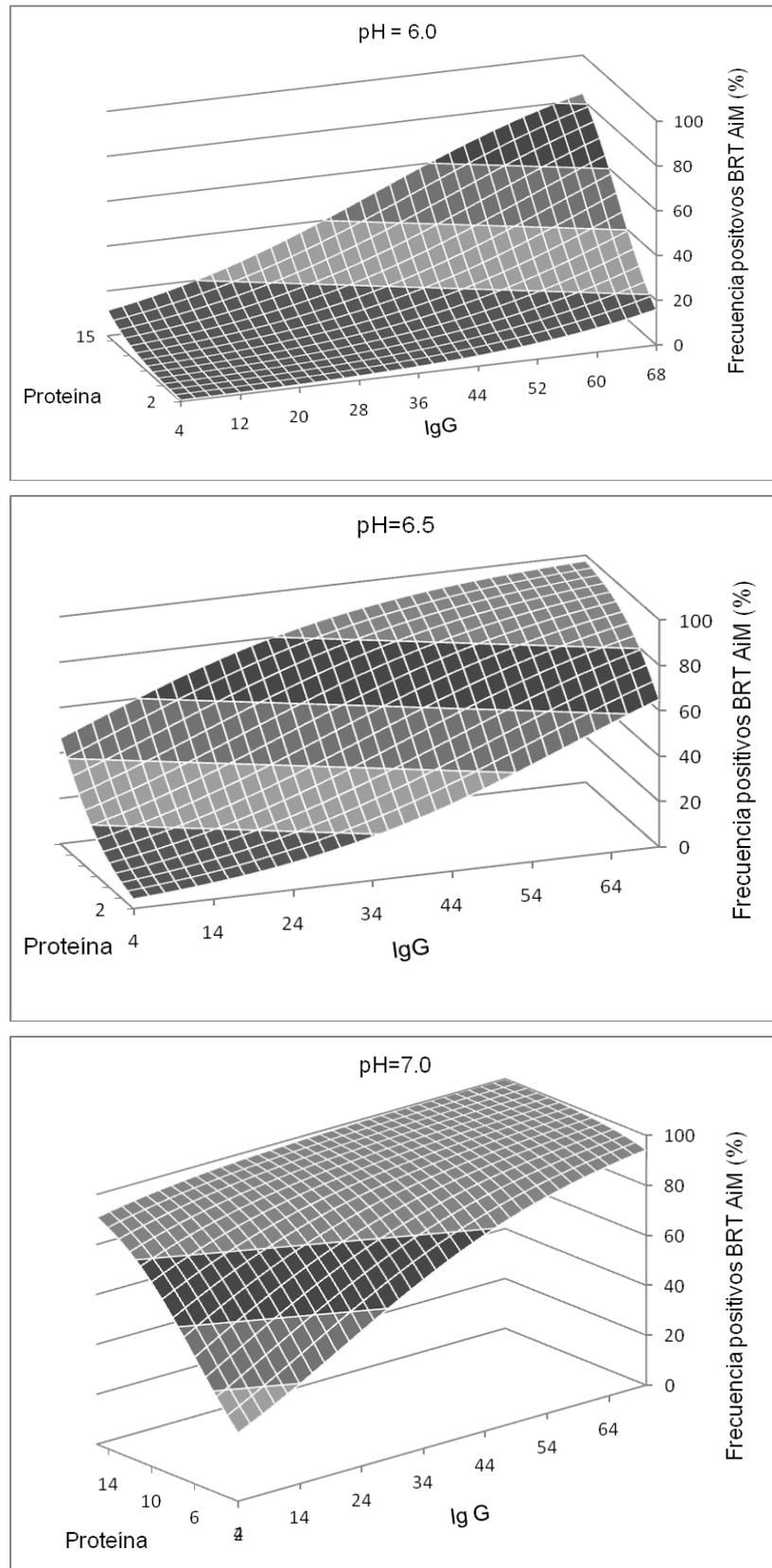


Figura 7. Efecto del pH y de la concentración de proteína y de IgG en el calostro ovino sobre la frecuencia de resultados positivos en el método BRT[®] AiM

Tabla 12. Resultados del método Delvotest[®] MCS con muestras de calostro ovino obtenidas a diferentes horas postparto

Método	Horas postparto	Frecuencia Resultados (%)		
		Negativos	Dudosos	Positivos
Delvotest [®] MCS	0-12	70,8	16,7	12,5
	24	87,5	4,2	8,3
	36	87,5	4,2	8,3
	48	75	12,5	12,5
	60	75	12,5	12,5
	72	72,7	18,2	9,1

n= 24 muestras en cada control

Si analizamos estos parámetros en función del resultado obtenido con este método de detección de inhibidores en leche (Tabla 14), observamos que las muestras que resultaron positivas presentan un mayor valor de pH y una mayor concentración de IgG que las muestras clasificadas como negativas.

A pesar de que Beukers (1993) señala que Delvotest[®] posee unas características específicas que lo hacen muy poco sensible a la presencia de inhibidores naturales en la leche, Oliver y col. (1984) también encontraron elevados porcentajes de resultados “falsos positivos” al analizar secreciones calostrales bovinas con este método.

Tabla 13. Efecto del tiempo transcurrido desde el parto y de las características fisicoquímicas del calostro ovino sobre las respuestas del método Delvotest[®] MCS

Propiedad	Valor “ χ^2 ”	Valor “p”
Hora	0,556255	0,4558
pH	31,1779	0,0001
Grasa	0,007365	0,9310
Proteínas	1,9668	0,1608
Inmunoglobulina G	14,8757	0,0001
Lactosa	1,16636	0,2861
Sólidos totales	0,820748	0,3650
Log RCS	0,051768	0,8200

Todos estos resultados pondrían de manifiesto el efecto inhibitor que sobre el crecimiento del microorganismo contenido en el método (*Geobacillus stearothermophilus* var *calidolactis*) parecen tener las elevadas concentraciones de inmunoglobulinas en las muestras de calostro. En ese sentido, un menor crecimiento del microorganismo de prueba provocaría una menor generación de ácido como consecuencia de su menor actividad metabólica y, en estas condiciones, sería posible que no se alcanzasen las condiciones ácidas necesarias para que el indicador ácido-base contenido en el método (púrpura de bromocresol) experimentara el cambio de color indicativo de resultado “conforme” (amarillo), especialmente si el pH de las muestras es inicialmente elevado.

Tabla 14. Valores medios de las propiedades fisicoquímicas del calostro ovino según la respuesta del método Delvotest[®] MCS

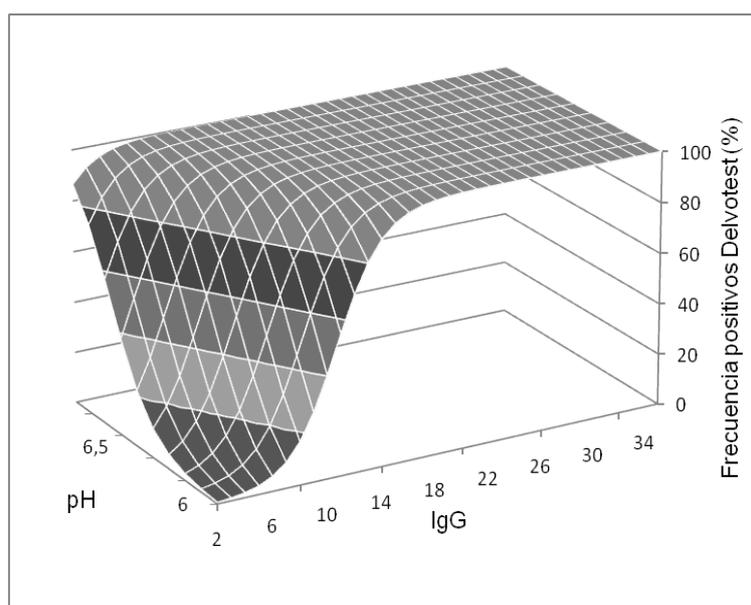
Propiedad	Respuesta del método Delvotest [®] MCS	
	Negativo (n=99)	Positivo (n=37)
pH	6,48 ± 0,17	6,72 ± 0,29
Inmunoglobulina G	19,95 ± 18,80	25,90 ± 19,07

La ecuación de regresión obtenida tras realizar el análisis estadístico de los datos fue la siguiente:

$$L = \text{logit} [P_p / P_n] = -53,9901 + 7,83393 [\text{pH}] + 0,0599406 [\text{lgG}]$$

$$(\chi^2 = 3,36649 \text{ y } p = 0,191236).$$

A partir de esta ecuación de predicción, que como puede observarse presentó un adecuado nivel de ajuste ($p < 0,1$), se determinó la superficie dosis-respuesta que se presenta en la Figura 8 y que permite observar el comportamiento de este método de control cuando se utiliza con muestras de calostro.

**Figura 8.** Efecto del pH y de la concentración de IgG del calostro ovino sobre la frecuencia de resultados positivos en el método Delvotest[®] MCS

En la Figura 8 se pone en evidencia el efecto de la concentración de IgG sobre la respuesta del método Delvotest[®] MCS y se puede comprobar que la frecuencia de resultados positivos alcanza su valor máximo (100%) a concentraciones relativamente pequeñas de IgG en las muestras de calostro, siendo más acusado este comportamiento a medida que se incrementa el pH de las muestras.

1.2.3. Método Eclipse® 100

En la Tabla 15 se presentan los resultados obtenidos al analizar las muestras de calostro con el método Eclipse® 100. La frecuencia de resultados negativos con muestras de calostro obtenidas en las primeras horas después del parto (0-12) es nula y a pesar de que posteriormente se incrementa con el tiempo, únicamente alcanza un valor de 34,8% a las 72 horas postparto. Estos porcentajes de muestras negativas tan bajos a lo largo de todo el periodo experimental están provocados, principalmente, por la aparición de un elevado porcentaje de resultados dudosos ya desde el inicio del experimento (91,7%), que a las 72 horas postparto todavía representan el 47,8%.

La mayor parte de estos resultados (54,4%) se corresponden con muestras que presentaron coloraciones intermedias verdosas, distintas a las que habitualmente se observan en este tipo de métodos. Estos resultados de difícil interpretación clasificados como dudosos, fueron más elevados en el método Eclipse® 100 que en los otros métodos considerados, BRT® AiM y Delvotest® MCS, donde apenas representaron el 8,1% y el 2,2%, respectivamente.

Tabla 15. Resultados del método Eclipse® 100 con muestras de calostro ovino obtenidas a diferentes horas postparto

Método	Horas postparto	Frecuencia Resultados (%)		
		Negativos	Dudosos	Positivos
Eclipse®100	0-12	0	91,7	8,3
	24	20,8	75	4,2
	36	29,2	58,3	12,5
	48	45,8	36,4	20,8
	60	50	20,8	29,2
	72	34,8	47,8	17,4

n= 24 muestras en cada control

Al estudiar las posibles causas de la aparición de este elevado porcentaje de resultados “falsos positivos” en el Eclipse® 100, se observa que únicamente tuvo un efecto estadísticamente significativo ($p < 0,05$) la concentración de lactosa de las muestras de calostro (Tabla 16). Este parámetro presentó un valor medio de $4,37 \pm 0,55\%$ en las muestras de calostro clasificadas como negativas y de $3,21 \pm 1,25\%$ para las que resultaron positivas.

La limitación del escaso número de trabajos realizados sobre este tema hace que no se puedan comparar los resultados obtenidos con los de otros autores.

Hay que señalar que el método Eclipse® 100 ha sido desarrollado con el mismo fundamento analítico que el Delvotest® MCS, es decir, el crecimiento del microorganismo de prueba (*Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*) modifica las condiciones del

indicador ácido–base incluido en el medio (púrpura de bromocresol), que pasa del color púrpura al amarillo, indicando un resultado negativo. Es posible que un menor nivel de lactosa en las muestras de calostro pudiera dar lugar a una menor generación de ácido láctico por parte de las bacterias contenidas en el medio, lo que dificultaría el descenso del pH hasta niveles adecuados ($\text{pH} < 5,2$) durante el tiempo estandarizado de incubación. Este hecho, podría provocar que el cambio de color del indicador fuera menos evidente dando lugar a coloraciones intermedias más o menos verdosas que en ningún caso pueden considerarse como un resultado “conforme” (negativo).

Tabla 16. Efecto de las características fisicoquímicas del calostro ovino sobre la respuesta del método Eclipse® 100

Propiedad	Valor “ χ^2 ”	Valor “p”
Hora	0,1760	0,6748
pH	0,4745	0,4909
Grasa	0,2208	0,6384
Proteínas	0,1884	0,6642
Lactosa	37,344	0,0001
Sólidos totales	0,2074	0,6488
Inmunoglobulina G	2,7574	0,0968
Log RCS	0,0037	0,9513

Aunque como se ha comentado anteriormente el método Eclipse® 100 y el Delvotest® MCS tienen el mismo fundamento, presentan algunas diferencias en el procedimiento analítico. En el método Eclipse® 100 se realiza una predifusión de las muestras durante una hora a temperatura ambiente y después de ella, las muestras se desechan, los pocillos se lavan con agua destilada y pasan a incubarse a una temperatura de 63-65 °C durante un tiempo aproximado de 2,5 horas. En cambio, en el método Delvotest® MCS, las muestras permanecen en los pocillos que conforman la placa durante todo el periodo de incubación.

Estas diferencias entre ambos métodos podrían explicar los resultados obtenidos, donde se observa que los parámetros fisicoquímicos del calostro no les afectan del mismo modo. Así, un menor tiempo de permanencia de las muestras en contacto con el medio donde se desarrolla el microorganismo, lo que sucede en el método Eclipse® 100, podría ser la causa de una menor difusión o efecto de los parámetros fisicoquímicos del calostro capaces de afectar la respuesta del método.

La ecuación de regresión obtenida tras realizar el análisis estadístico de los datos fue la siguiente:

$$L = \text{logit} [Pp / Pn] = 6,3192 - 1,39357 [L]$$

$$(\chi^2 = 0,375026 \text{ y } p = 0,829018)$$

Esta ecuación de predicción de resultados “falsos positivos” para el método Eclipse® 100 presentó un adecuado nivel de ajuste con los resultados observados ($p \geq 0,1$). A partir de esta expresión, se calculó la curva dosis-respuesta que se presenta en la Figura 9, en la que se puede observar el efecto de la concentración de lactosa en las muestras de calostro sobre la respuesta del método Eclipse® 100.

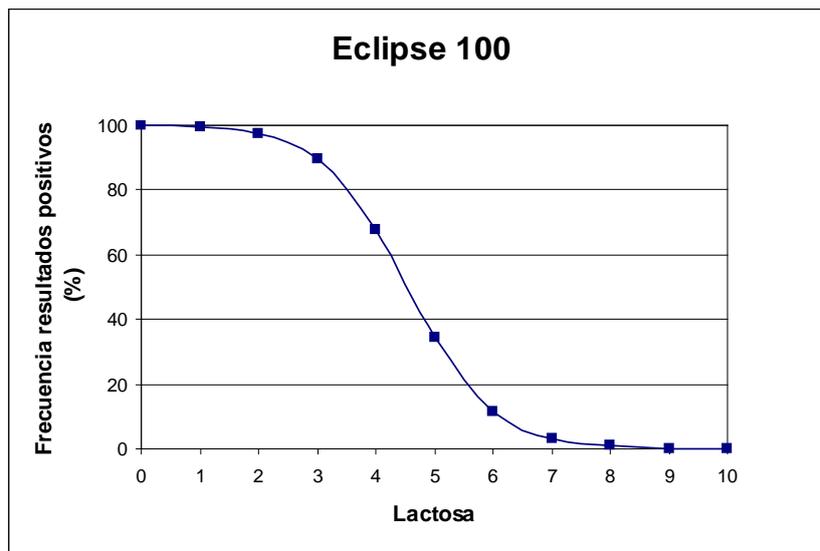


Figura 9. Efecto de la concentración de lactosa en el calostro de oveja sobre la frecuencia de resultados positivos al método Eclipse® 100

2. SEGUNDO ESTUDIO. Efecto de la presencia de calostro en la leche de oveja sobre la respuesta de los métodos microbiológicos de detección de inhibidores.

2.1. Características de las muestras de leche de oveja

En el segundo experimento se estudia el efecto que la incorporación de calostro a la leche de oveja como consecuencia de malas prácticas de ordeño, pueda tener sobre la respuesta de diferentes métodos microbiológicos de detección de antibióticos en leche.

Las características de las muestras de leche adicionadas de calostro, obtenido en tres momentos diferentes después del parto (0-12, 24 y 48 horas), utilizadas en este segundo experimento se presentan en la Tabla 17. En ella se observa la modificación de todos los parámetros fisicoquímicos considerados a medida que se incrementa la proporción de calostro en la leche, especialmente en el caso de las muestras adicionadas de secreciones calostrales muy próximas al parto (0-12 horas).

Tabla 17. Características fisicoquímicas de las muestras de leche adicionadas de calostro obtenido a diferentes tiempos postparto

Calostro (%)	pH			Grasa (%)			Proteína (%)			IgG (mg/ml)			Lactosa (%)			RCS ($\times 10^3$ cel/ml)		
	0-12	24	48	0-12	24	48	0-12	24	48	0-12	24	48	0-12	24	48	0-12	24	48
0	6,75	6,75	6,75	7,11	7,11	7,11	4,96	4,96	4,96	4,55	4,55	4,55	5,25	5,25	5,25	402	402	402
1	6,75	6,75	6,75	7,15	7,15	7,13	5,13	5,06	4,99	5,02	4,90	4,73	5,21	5,22	5,24	452	416	411
2,5	6,74	6,74	6,75	7,20	7,20	7,16	5,38	5,22	5,04	5,72	5,42	4,99	5,16	5,18	5,22	528	439	426
5	6,73	6,73	6,75	7,30	7,29	7,20	5,79	5,48	5,12	6,90	6,29	5,43	5,07	5,11	5,19	654	476	450
7,5	6,72	6,73	6,74	7,39	7,39	7,25	6,21	5,74	5,19	8,07	7,17	5,86	4,98	5,05	5,17	780	513	474
10	6,71	6,72	6,74	7,48	7,48	7,29	6,63	6,00	5,27	9,25	8,04	6,30	4,90	4,98	5,14	906	550	498
12,5	6,70	6,71	6,74	7,58	7,57	7,34	7,04	6,26	5,35	10,42	8,91	6,74	4,81	4,91	5,11	1032	588	522
15	6,69	6,70	6,74	7,67	7,66	7,39	7,46	6,52	5,43	11,60	9,78	7,18	4,72	4,84	5,08	1158	625	546
20	6,67	6,68	6,73	7,86	7,85	7,48	8,29	7,04	5,58	13,94	11,53	8,05	4,54	4,70	5,02	1410	699	594
22,5	6,66	6,68	6,73	7,95	7,94	7,52	8,71	7,30	5,66	15,12	12,40	8,49	4,45	4,64	5,00	1536	736	618
25	6,65	6,67	6,73	8,05	8,03	7,57	9,13	7,56	5,74	16,29	13,27	8,93	4,37	4,57	4,97	1662	774	642
27,5	6,64	6,66	6,73	8,14	8,12	7,62	9,54	7,82	5,81	17,47	14,14	9,37	4,28	4,50	4,94	1788	811	666
30	6,63	6,65	6,72	8,23	8,22	7,66	9,96	8,08	5,89	18,64	15,01	9,80	4,19	4,43	4,91	1914	848	690
35	6,61	6,63	6,72	8,42	8,40	7,75	10,79	8,60	6,05	20,99	16,76	10,68	4,01	4,29	4,85	2166	922	738
40	6,59	6,62	6,71	8,61	8,59	7,85	11,63	9,12	6,20	23,34	18,50	11,55	3,83	4,16	4,80	2418	997	786
50	6,56	6,59	6,71	8,98	8,96	8,03	13,30	10,16	6,51	28,04	21,99	13,31	3,48	3,89	4,69	2922	1146	883

2.2. Análisis de muestras de leche adicionadas de calostro ovino mediante métodos microbiológicos de detección de inhibidores.

Los resultados obtenidos con los tres tipos de calostro utilizados en métodos microbiológicos se presentan en la Tabla 18. Como se puede observar, con concentraciones del 5%, 12,5% y 22,5% de calostro de 0-12 horas en la leche, se obtienen un 37,5%, 25% y 6,3% de resultados positivos para los métodos BRT[®] AiM, Delvotest[®] MCS y Eclipse[®] 100, respectivamente.

Tabla 18 Frecuencia de resultados positivos según la concentración y el tipo de calostro añadido a la leche de oveja

Método analítico	Tipo calostro	Concentración calostro (%)											
		0	1	2,5	5	7,5	10	12,5	15	20	25	35	50
BRT [®] AiM	12 h	0	0	0	37,5	37,5	56,3	100	100	100	100	100	100
	24 h	0	0	0	0	0	31,3	43,8	100	100	100	100	100
	48 h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Delvotest [®] MCS	12 h	0	0	0	0	0	0	25	50	100	100	100	100
	24 h	0	0	0	0	0	0	0	50	50	100	100	100
	48 h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Método analítico	Tipo calostro	Concentración calostro (%)											
		0	2,5	5	10	15	20	22,5	25	27,5	30	40	50
Eclipse [®] 100	12 h	0	0	0	0	0	0	6,3	25	81,3	100	100	100
	24 h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	50	100	100
	48 h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Cuando se adiciona a la leche la mezcla de calostros de 24 horas se deduce que son necesarias concentraciones más elevadas para provocar la aparición de un resultado positivo en todos los métodos considerados (BRT[®] AiM=10%, Delvotest[®] MCS=15% y Eclipse[®] 100=30%) siendo nuevamente el método BRT[®] AiM el más afectado por la presencia de esta secreción en la leche.

Sin embargo, con la mezcla de calostros obtenida a las 48 horas postparto, no se observan interferencias con ninguno de los métodos utilizados hasta una concentración del 50%, ya que los resultados obtenidos fueron negativos en todos los casos.

Estos resultados podrían estar relacionados con el marcado descenso de la concentración de proteína y de IgG en el calostro ovino que se produce durante las primeras 48 horas después el parto (Csapo y col. 1994) y que explicarían, en gran parte, la normalización de los resultados analíticos transcurrido este tiempo.

Los resultados del análisis estadístico del efecto del tipo de calostro, según el tiempo transcurrido desde el parto, y su concentración en la leche de oveja sobre la respuesta de los distintos métodos microbiológicos de detección de inhibidores, se resume en la Tabla 19.

En dicha Tabla se evidencia el efecto significativo ($p < 0,001$) de estos dos factores sobre la presencia de resultados positivos (“no conformes”) en todos los métodos estudiados. Hay que señalar que el calostro obtenido a las 48 horas postparto, no se ha incluido en el análisis estadístico de los datos debido a que los resultados observados con este tipo de secreción fueron negativos en todos los casos.

Tabla 19. Efecto del tipo de calostro y su concentración en la leche de oveja sobre la respuesta de los métodos de detección de inhibidores

Método	Tipo de calostro		Concentración de calostro	
	Valor “ χ^2 ”	Valor “p”	Valor “ χ^2 ”	Valor “p”
BRT® AiM	28,4105	0,0001	393,97	0,0001
Delvotest® MCS	8,7978	0,0030	395,64	0,0001
Eclipse® 100	43,706	0,0001	379,68	0,0001

Las ecuaciones de predicción obtenidas al aplicar el modelo de regresión logística en los tres métodos microbiológicos considerados se recogen en la Tabla 20, donde también se muestra el buen nivel de ajuste alcanzado en todos los casos ($p \geq 0,1$).

Tabla 20. Ecuaciones de predicción para los métodos microbiológicos de detección de inhibidores en leche de oveja

Método	$L = \text{Logit } [P] = \beta_0 + \beta_1 [TC] + \beta_2 [\text{Calostro}]$	Valor “ χ^2 ”	Valor “p”
BRT® AiM	$L = -5,1049 - 2,5217[TC] + 0,6382[\text{Calostro}]$	3,7666	0,2878
Delvotest® MCS	$L = -7,9546 - 1,5359[TC] + 0,5327[\text{Calostro}]$	2,7114	0,4383
Eclipse® 100	$L = -29,4168 - 4,6043[TC] + 1,1344[\text{Calostro}]$	0,9345	0,8171

$L = \ln(\text{probabilidad de resultado (+)} / 1 - \text{probabilidad resultado (+)})$; Tipo calostro: Calostro 12 h, TC=0 y Calostro 24 h, TC=1; [Calostro]: concentración (%) de calostro en la leche de oveja

A partir de estas ecuaciones se han elaborado las curvas dosis-respuesta de los distintos métodos considerados en función del tipo de calostro (0-12 y 24 horas) y de su concentración en la leche de oveja que se presentan en la Figura 10. En este gráfico observamos que existe un desplazamiento de las curvas respuesta con el incremento del tiempo transcurrido desde el parto.

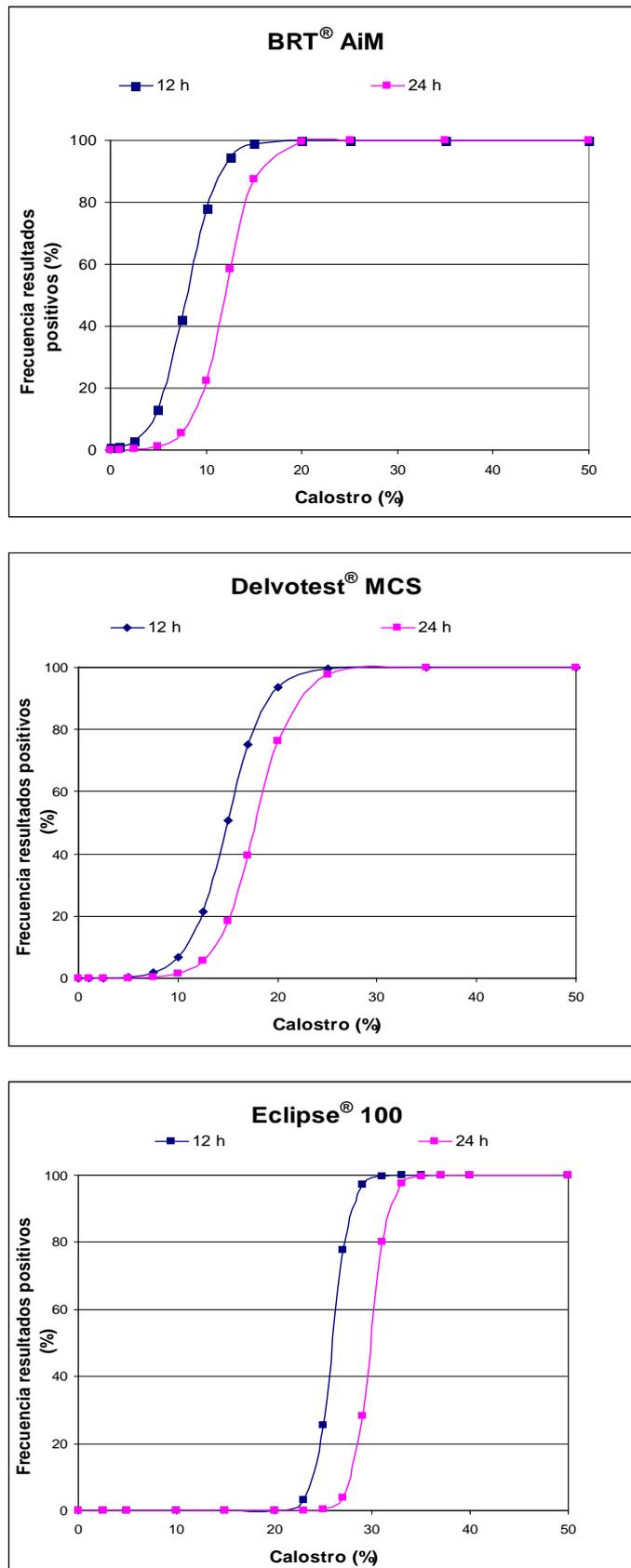


Figura 10. Efecto del tipo de calostro y su concentración en la leche de oveja sobre la frecuencia de resultados positivos en los métodos microbiológicos de detección de inhibidores en la leche.

Para profundizar en el estudio del efecto de la presencia de calostro en la leche sobre las respuestas de los métodos microbiológicos de detección de inhibidores, se calculó la concentración mínima inhibitoria de calostro (CMI) para cada uno de los métodos y tipo de calostros estudiados. La CMI se consideró como el porcentaje de calostro en la leche de oveja que provoca la aparición de un 95% de resultados positivos.

En la Figura 11 se presentan los niveles de interferencia del calostro calculados en forma de CMI. Resulta evidente que la CMI de calostro depende del tipo de calostro y del método considerado. En general, se incrementa a medida que aumenta el tiempo transcurrido desde el parto, es decir, los porcentajes de calostro correspondientes a la CMI son superiores en el calostro de 24 horas postparto, lo que indica que se necesita una mayor concentración de este tipo de calostro para provocar la aparición de un resultado positivo.

En cuanto a la CMI y los métodos de detección de inhibidores, los valores más elevados se presentan en el método Eclipse® 100, lo que indicaría que este método se ve menos afectado por la presencia de calostro en la leche de oveja.

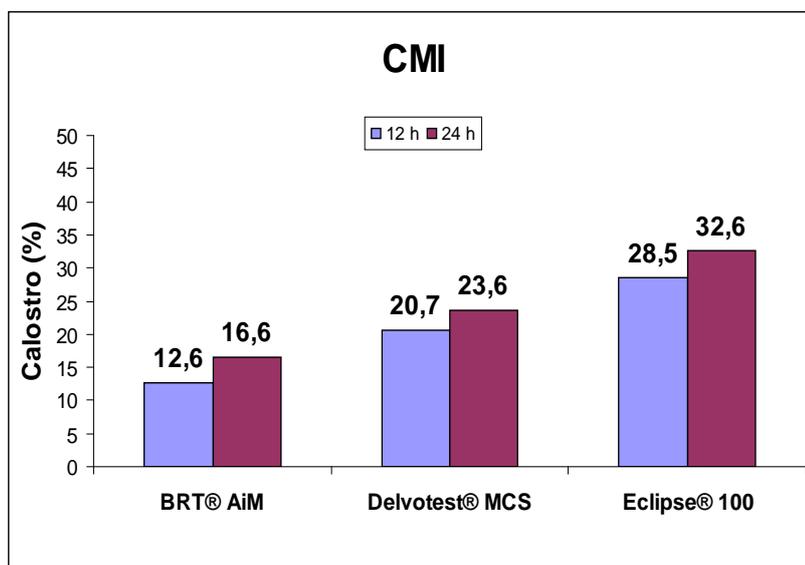


Figura 11. Concentración mínima inhibitoria de calostro ovino (CMI) en distintos métodos microbiológicos de detección de inhibidores en la leche

CONCLUSIONES

V.- CONCLUSIONES

De la realización de este trabajo relativo al efecto de la presencia de calostro sobre los métodos microbiológicos de detección de inhibidores en la leche de oveja pueden extraerse las siguientes conclusiones:

1. Primer Estudio. Evaluación de la respuesta de los métodos microbiológicos de detección de inhibidores en leche con muestras de calostro ovino

- Los métodos microbiológicos de detección de inhibidores en leche BRT[®] AiM, Delvotest[®] MCS y Eclipse[®] 100 presentan un elevado porcentaje de resultados “falsos positivos” cuando se utilizan con muestras de calostro de ovino obtenidos hasta las 72 horas postparto
- La aparición de elevados porcentajes de resultados positivos o “falsos no conformes” está relacionada con determinadas características fisicoquímicas del calostro, principalmente el pH y el contenido en inmunoglobulina G
- En general, los métodos microbiológicos de detección de inhibidores en leche (BRT[®] AiM, Delvotest[®] MCS y Eclipse[®] 100) no resultan adecuados para el control de la presencia de residuos de antibióticos de secado en el ganado ovino durante los tres primeros días postparto, ya que pueden aparecer en elevado porcentaje de resultados positivos o “no conformes” que desaconsejan la realización de esta práctica

2. Segundo estudio. Efecto de la presencia de calostro en la leche de oveja sobre los métodos microbiológicos de detección de inhibidores

- La incorporación de calostro ovino a la leche de tanque puede afectar a la respuesta de los métodos microbiológicos de detección de inhibidores en la leche de oveja aunque su efecto depende del tipo de calostro (horas postparto) y del método considerado
- En general, las interferencias debidas a la presencia de calostro se observan a concentraciones relativamente elevadas en la leche de oveja (5-25%), especialmente con secreciones calostrales muy próximas al parto (0-12 horas)
- Transcurridas 48 horas postparto, las posibilidades de obtener resultados positivos por la presencia de calostro en la leche disminuyen de manera considerable, ya que con concentraciones del 50% todos los resultados fueron negativos con independencia de la edad del calostro y del método considerado

BIBLIOGRAFÍA

VI. BIBLIOGRAFIA

- Althaus R.L., Molina P., Rodríguez M., Fernández N., 2001. Evaluation of the BRT[®] method for the detection of β -lactam antibiotics in ewe milk. *Milchwissenschaft*, 56: 568-572.
- Althaus R., Peris C., Montero A., Torres A., Molina P. 2002. Detection limits of antimicrobial agents in ewe milk by Delvotest[®]. *Milchwissenschaft*, 57:660-663.
- 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.
- Andrew S.M. 2001. Effect of composition of colostrum and transition milk from Holstein heifers on specificity rates of antibiotic residue tests. *J. Dairy Sci.*, 84: 100-106.
- Barbosa M., 1997. Occurrence of antibiotics in ewe and goat milk - application and suitability of various test kits. Symposium "Non-destructive testing pasteurization requirements and antibiotics in Dairy Products. FIL-IDF. Lisboa, Portugal.
- Bencini R., Pulina G. 1997. The quality of sheep milk: a review. *Australian J. Exp. Agric.*, 37: 485-504.
- Beukers R., 1993. Some special aspects of Delvotest[®]. *IDF Bull.* n° 283: 20-23. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica.
- Bishop J.R., White C. H.M. 1984. Antibiotic residues detection in milk. A review. *J. Food Prot.*, 47: 647-652.
- Botsoglou N.A., Fletouris D.J. 2001. Drug residues in foods. Pharmacology, food safety and analysis. Ed. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Brouillet P. 1994. Control of the presence of inhibitors in milk. *Rec. Med. Vet.*, 170: 443-455.
- Carlsson A., Björck L. 1989. Lactoferrin and lysozyme in milk during acute mastitis and their inhibitory effect in Delvotest. *J. Dairy Sci.*, 72: 3166-3175.
- Carlsson A., 1991. Detection of inhibitory substances in milk. Dissertation. Institutionen för Livsmedelsvetenskap. Swedish University of Agricultural Sciences.
- Csapo J.J., Csapo-Kiss Z., Martin T.G., Szentpeteri J., Wolf G. 1994. Composition of colostrum from goats, ewes and cows producing twins. *Int. Dairy J.*, 1: 445-458.
- Csapo J.J., Keszthelyi T., Csapo-Kiss Z., Lengyel A., Andrassy-Baka G., Varga-Visi E. 1998. Composition of colostrum and milk of different breeds of ewes. *Acta Agraria Kaposvariensis*, 2: 1-21.
- Cullor J. S. 1992. Test for identifying antibiotic residues in milk: how well do they work. *Vet. Med.*, 87:1235.
- Cullor J.S., Van Eenennaam A., Smith W. L., Dellinger J., Perani L., Jensen L., 1992. Antibiotic residue assays: can they be used to test milk from individual cows. *Vet. Med.*, 87: 477-485.

- Cullor J. S., Eenennaam A. Van., Gardner I., Perani L., Dellinger J., Smith W. L., Thompson T., Payne M. A., Jensen L., Guterbock W. M. 1994. Performance of various tests used to screen antibiotic residues in milk samples from individual animals. *J. AOAC Int.*, 77: 862-870.
- Decisión 2002/657/CEE del Consejo, del 12 de Agosto de 2002, por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados. *Diario Oficial nº L 73*: 30-31.
- Demoly P., Romano A. 2005. Update on Beta-lactam allergy diagnosis. *Curr. Allergy Asthma Rep.*, 1:9-14.
- Directiva 96/23/CEE del Consejo, de 29 de abril de 1996, relativa a las medidas de control aplicables respecto de determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos y por la que se derogan las Directivas 85/358/CEE y 86/469/CEE y las Decisiones 89/187/CEE y 91/664/CEE. *Diario Oficial nº L 125*: 10-32.
- Egan J., Meaney W.J. 1984. The inhibitory effect of mastitis milk and colostrum on test methods used for antibiotic detection. *Ir. J. Fd. Sci. Technol.*, 8: 115-120.
- Gajdušek S., Kráčmar S., Kuchtík J., Jelínek P. 2002. Changes in basic composition of sheep colostrum (during first 72 hours after parturition). *Acta Mendelovy Zemedelske a Lesnicke University V Brne*, 51: 55-59.
- Hadjipanayiotou M. 1995. Composition of ewe, goat and cow milk and of colostrum of ewes and goats. *Small Rum. Res.*, 18: 255-262.
- Klobasa F., Herbort B., Kallweit E. 1988. Immunoglobulinversorgung neugeborener schafklämmer durch die kolostralmilch. *Tagung der Fachgruppe "Krankheiten der kleinen Wiederkauer"*, p. 56-60
- Kholif A.M., EL-Loly M.M. 2001. Colostral and blood sera immunoglobulin concentrations among goats and sheep. *Egyptian J. Dairy sci.*, 29: 239-250.
- Macho M.I. 2003. Enzimoinmunoanálisis en el análisis de residuos de antibióticos. 15ª Jornada sobre Residuos en alimentos. CNA-AESA.
- MARM. 2008. Anuario de estadística agroalimentaria. Ministerio de Agricultura y de Medio Rural y Marino. 1192 pp.
- Mäyra-Mäkinen, A. 1993. The Valio T 101. *IDF Bull. nº 283*: 29-31. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica.
- Mitchell J.M., Griffiths 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. Food Prot.*, 61: 742-756.
- Molina P. 1987. Composición y factores de variación de la leche de ovejas de raza Manchega. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. 239 pp.
- Molina M.P., Gallego L. 1994. Composición de la leche: Factores de variación. 191-208. In: *Ganado ovino. Raza Manchega*. Ed. Mundi-Prensa.
- Molina P., Althaus R.L., Zorraquino M.A., Molina A., Fernández N. 2002. Evaluation of Penzym® enzymatic test in ewe's milk. *Milchwissenschaft*, 57: 33-35.

- Molina M.P., Althaus R.L., Balasch S., Torres A., Peris C., Fernández N. 2003a. Evaluation of screening test for detection of antimicrobial residues in ewe milk. *J. Dairy Sci.*, 86: 1947-1952.
- Molina M. P., Althaus R. L., Molina A., Torres A., Fernández N. 2003b. Antimicrobial agents detection in ewe milk by microbial inhibitor test (Brilliant Black Reduction Test-BRT® AiM)”. *Int. Dairy J.*, 13: 821-826.
- Molina P., Berruga I., Molina A. 2009. La calidad de la leche de oveja. (355-367). In: *Ovinotecnia. Producción y economía en la especie ovina*. Ed. Prensas Universitarias de Zaragoza. Zaragoza, España.
- Montero A., Althaus R.L., Molina A., Berruga I., Molina M.P. 2005. Detection of antimicrobial agents by specific microbiological method (Eclipse® 100) for ewe milk. *Small Rum. Res.*, 57 : 229-237.
- Müller F., Jones A., 1993. BR-Test and BRT-AS Methods. *IDF Bull n° 283*: 24-28. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica.
- Nowak R., Poindron P. 2006. From birth to colostrum: early steps leading to lamb survival. *Reprod. Nutr. Dev.* 46: 431-446.
- Pellegrini O., Remeuf F., Rivemale M, Barillet F. 1997. Renneting properties of milk from individual ewes: influence of genetic and non-genetic variables, and relationship with physicochemical characteristics. *J. Dairy Res.*, 64: 355-366.
- Oliver S.P., Doby R.T., Prange R.W., Tritschler J.P. 1984. Residues in colostrum following antibiotic dry cow therapy. *J. Dairy Sci.*, 67: 3081-3084.
- Paape M.J., Wiggans G.R., Bannerman D.D., Thomas D.L., Sanders A.H., Contreras A., Moroni P., Miller R.H. 2007. Monitoring goat and sheep milk somatic cell counts. *Small Rum. Res.*, 68: 114-125.
- Packham W., Broome M.C., Limsowtin G.K., Roginski H. 2001. Limitations of standard antibiotic screening assays when applied to milk for cheesemaking. *Australian J. Dairy Tech.*, 56:15-18.
- Perreten V., Teuber M. 1995. Antibiotic resistant bacteria in fermented dairy products – a new challenge for raw milk cheese. In: *Residues of antimicrobial drugs and other inhibitors in milk*. IDF S.I. n° 9505:144-148.
- Raynal-Ljutovac K., Gaborit P., Lauret A. 2005. The relationship between quality criteria of goat milk, its technological properties and the quality of the final products. *Small Rum. Res.*, 60: 167-177.
- Real Decreto 2484/1967, de 21 de septiembre, por el que se aprueba el texto del Código Alimentario español. *BOE*, 17 de octubre de 1967, n° 248: 14180-14187.
- 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 leche. *BOE*, 19 de febrero de 2004, n° 43: 7802-7806.
- 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 leche. BOE, 17 de enero de 2008, nº 15: 3508-3519.
- Reglamento (UE) 37/2010 de la Comisión, de 22 de diciembre, relativo a las sustancias 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 L15: 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) 2377/90 del Consejo y se modifican la Directiva 2001/82/CE del Parlamento Europeo y del Consejo y el Reglamento (CE) 726/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo. Diario Oficial nº L152: 11-22.
- Reglamento 852/2004/CEE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, relativo a la higiene de los productos alimenticios. Diario Oficial nº L139: 1-54.
- 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 L139: 55-205.
- Reglamento 854/2004/CEE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, por el que se establecen normas específicas para la organización de controles oficiales de los productos de origen animal destinados al consumo humano. Diario Oficial nº L139: 206-319.
- Roca M., Molina M.P., Villegas L., Gabirondo E., Althaus R.L. 2009. Effect of cold storage on stability of penicillins in milk. Sesión 7, p. 15. International Dairy Federation. World Dairy Summit. Berlín, Alemania.
- Rodríguez C., Castro N., Capote J., Morales de La Nuez A., Moreno Indias I., Sánchez Macías D., Argüello A. 2009. Effect of colostrum immunoglobulin concentration on immunity in Majorera goat kids. *J. Dairy Sci.*, 92: 1696-1701.
- Schiffmann A.P., Schürtz M., Wiesner H. 1992. False negative and positive results in testing for inhibitory substances in milk. Factors influencing the brilliant black reduction test (BRT). *Milchwissenschaft*, 47: 770-772.
- Tyler J. W., Cullor J. S., Erskine R. J., Smith W. L., Dellinger J., Macclure K., 1992. Milk antimicrobial drug residue assay results in cattle with experimental, endotoxin-induced mastitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 210: 1378-1384.
- Tsioulpas A., Grandinson A.S., Lewis M.J. 2007. Changes in physical properties of bovine milk from the colostrum period to early lactation. *J. Dairy Sci.* 90: 5012-5017.
- Vijil E., Gonzalo C., Hurtado E., Ruiz-Poveda J., Ciudad C., Prieto M.F. 1986. Evolución y características del calostro ovino (razas Manchega, Churra y Karakul) I: Variación de la composición química. *Rev. Esp. Lechería*, 5: 9-19.
- Vihan V.S. 1988. Immunoglobulin levels and their effect on neonatal survival in sheep and goats. *Small Rum. Res.*, volume 1(2): 135-144.
- Žvirauskiene R., Salomskiene J. 2007. An evaluation of different microbial and rapid test for determining inhibitors in milk. *Food Cont.*, 18: 541-547.

Zorraquino M. A. 1996. Aplicación de un sistema de análisis de riesgos y puntos críticos para asegurar una leche libre de residuos de medicamentos veterinarios. XIII Reunión de Técnicos especialistas en control de mastitis y calidad de leche (G-Temcal). Pamplona.

Zorraquino M. A., Berruga M. I., Solaz T. 2003. Análisis de las técnicas de detección de residuos de medicamentos veterinarios en la leche cruda y sistema de control. Informe Técnico. Federación Industrias Lácteas Españolas (INLAC). Madrid.

