

I. INTRODUCCIÓN

1. RESIDUOS DE SUSTANCIAS ANTIMICROBIANAS EN LA LECHE

1.1. CONSIDERACIONES PREVIAS

El concepto de calidad en la leche ha ido cobrando, últimamente, cada vez más importancia, debido a la actuación que ha tenido lugar por parte de la industria transformadora, que requiere un producto con características adecuadas para su elaboración, el consumidor, que demanda alimentos de calidad y producidos con criterios de seguridad alimentaria y, por último, el ganadero, interesado cada vez más en obtener un producto de calidad, sobre todo cuando ésta le va a suponer el conseguir un mayor precio por el mismo.

También la calidad higiénico-sanitaria de los alimentos es uno de los aspectos cada vez más importantes y exigido por la Administración. Varios parámetros higiénicos, como la presencia de microorganismos patógenos, de residuos y de contaminantes, son factores decisivos en la calidad e inocuidad de los alimentos y, por tanto, en la protección del consumidor.

Actualmente, la legislación Comunitaria (Directivas 92/46/CEE y 94/71/CEE) 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 superan los límites admisibles (bacterias y células somáticas).

Así, en la leche se pueden encontrar residuos de diferente origen, composición química y toxicidad que son causados por los sistemas modernos utilizados en las explotaciones agrarias en general (herbicidas, plaguicidas, etc) y en las granjas lecheras actuales en particular, debido al tratamiento de los animales con diferentes fármacos, así como por la utilización de detergentes y/o desinfectantes, entre otros productos.

Los tratamientos farmacológicos, según la composición intrínseca de la molécula, excipiente, dosis y vía de administración, generan residuos (sustancia original y/o metabolitos) que pueden persistir durante un mayor o menor tiempo tanto en los animales tratados como en los productos elaborados (Bevil, 1989; Debackere, 1995).

El Reglamento 2377/90/CEE define los residuos de medicamentos veterinarios como *“todas las sustancias farmacológicas activas, ya sean principios activos, excipientes o productos de degradación, y sus metabolitos que permanezcan en los productos alimenticios obtenidos a partir de animales a los que se les hubiere administrado el medicamento veterinario de que se trate”*.

Actualmente, los residuos más importantes que aparecen en la leche, son los Residuos de Medicamentos Veterinarios (RMV), especialmente los antimicrobianos (que comprenden los antibióticos y las sulfonamidas). El empleo de estas sustancias en el tratamiento de las enfermedades infecciosas de la ubre del ganado lechero, principalmente mastitis, está recomendado para su control (Miller, 1995). Estos medicamentos producen residuos de antimicrobianos en la carne y en la leche, que pueden encontrarse por encima de los límites de seguridad establecidos por la legislación.

La normativa española de exigencia de la mayor ausencia posible de residuos en la leche es relativamente reciente y coincidente con nuestra entrada en la Comunidad Europea y la adopción de su marco legal.

La normativa europea, respecto a los RMV viene marcada por la entrada en vigor del Reglamento CEE 2377/90. En este reglamento se fijan las concentraciones máximas de Residuos de Medicamentos Veterinarios (Límites Máximos de Residuos, LMRs) que pueden encontrarse en los alimentos de origen animal, entre ellos la leche, para proteger al consumidor de posibles riesgos toxicológicos de dichos residuos.

Por otra parte en la Directiva 96/23/CEE, del Consejo, de 29 de abril de 1996, recogida íntegramente en el Real Decreto 1749/1998 de 31 de julio, relativa a las medidas de control aplicables a determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos, se establecen los LMRs de compuestos químicos que pueden estar presentes en los productos animales, entre los que se cita la leche, así como las medidas que deberán tomarse en caso de infracción.

Además, por el potencial riesgo para la salud humana que representan, los residuos y contaminantes, englobados en la mayor parte, dentro de lo que se conoce como sustancias inhibidoras, éstos ocupan un lugar importante a la hora de definir la calidad y seguridad de un producto alimentario. De ahí la necesidad de localizar su origen, controlar su presencia y así evitar su llegada a la industria transformadora y al consumidor.

1.2. ORIGEN Y EXCRECIÓN DE LOS RESIDUOS DE MEDICAMENTOS

La evolución que han sufrido las explotaciones ganaderas hacia sistemas de producción más industrializados, en los que una elevada concentración de animales en espacios reducidos es habitual, conlleva mayores riesgos en la aparición de enfermedades del ganado. Para evitar pérdidas importantes en la cabaña, así como económicas, se recurre al empleo de sustancias farmacológicas (Debackere, 1995).

Respecto a los tratamientos de los animales con diferentes fármacos, hay que destacar concretamente el uso de aquellos de tipo antiinfecciosos (antibióticos, sulfonamidas, quinolonas, etc.). Para el ganado productor de leche se utilizan principalmente tratamientos curativos aplicados a los animales que padecen infecciones microbianas de la ubre, o bien tratamientos de tipo preventivos que se realizan en el momento del secado, para evitar la aparición

de dichas patologías en la lactación siguiente (Luthman, 1993; Van Eenennaam *et al.*, 1993).

Fabre *et al.* (1995), realizaron un estudio en 1.018 granjas de vacuno lechero en Francia con el fin de identificar las posibles causas de restos de inhibidores en la leche. Del total de explotaciones, 625 resultaron “granjas positivas”, de las cuales en 516 fue posible identificar las causas que provocaron dicha presencia.

En la Figura 1 se pueden observar los resultados del estudio anteriormente citado, y cómo los tratamientos relacionados con la mastitis son la causa principal de la presencia de residuos de medicamentos en la leche que, junto a los tratamientos de secado, alcanzan el 88%. Por el contrario, otras posibles causas no relacionadas con la glándula mamaria sólo suponen el 2% del total de los casos.

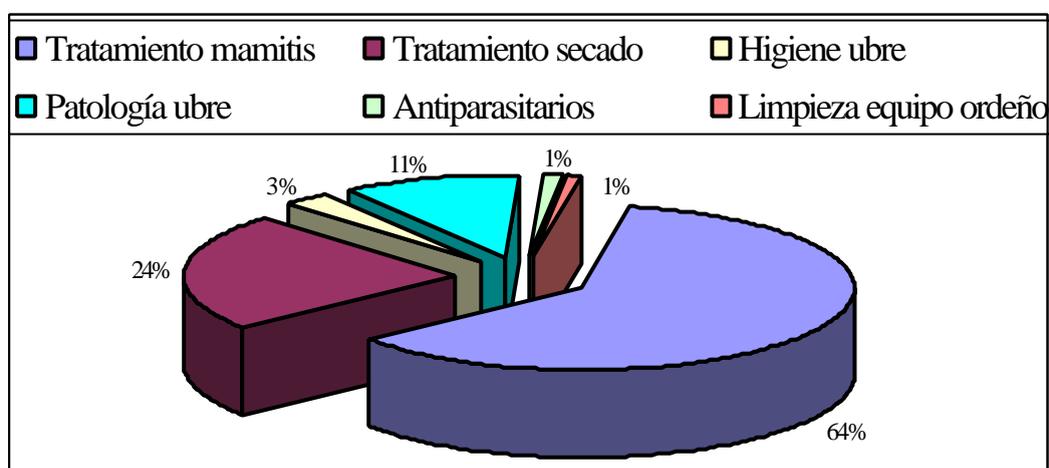


Figura 1. Frecuencias relativas (%) de las causas más frecuentes de la presencia de residuos en la leche (n = 516)
Fuente: Fabre *et al.* (1995)

Por esta causa, los programas de prevención y control de las mastitis, en especial de la mastitis subclínica, son fundamentales dado que constituyen el foco más importante de la presencia de residuos en la leche de vaca.

Las sustancias antimicrobianas se administran de diferentes formas, desde inyecciones (subcutáneas, intramusculares, endovenosas, etc), productos intramamarios, por vía oral; y en forma de aditivos alimenticios o disueltos en el agua, para solucionar las infecciones que sufren o que podrían padecer los animales.

La mayor parte de los fármacos se distribuyen casi inmediatamente en todo el organismo, especialmente si son administrados por vía intravenosa. En otros casos, el desplazamiento del medicamento en el organismo obedece a leyes físico-químicas y bioquímicas específicas.

A través del metabolismo de un fármaco (Figura 2), se producen una serie de cambios químicos en el mismo, generalmente inducidos por enzimas, antes de su eliminación final del organismo, de manera que este proceso se considera uno de los mecanismos de eliminación fisiológica o de disminución de la actividad del medicamento suministrado. En ocasiones, este metabolismo puede tener un efecto contrario, y generar un compuesto intermediario con actividad o toxicidad mayor.

La eliminación en el organismo de la forma activa del medicamento depende esencialmente de los procesos de biotransformación y excreción, aunque también de otros factores, entre los que destacan el volumen de distribución y la unión del fármaco a proteínas plasmáticas (Rang *et al.*, 2000).

La forma más utilizada para expresar la velocidad a que se eliminan los medicamentos es mediante el concepto de vida media ($t_{1/2}$), que se define como el tiempo necesario para que se reduzca un 50% una concentración plasmática determinada. A partir de la vida media de un medicamento, es posible predecir, de manera aproximada, la cantidad de residuos del mismo.

En orden de importancia, las vías de excreción de los medicamentos son: renal, biliar, pulmonar, mamaria, salival, secreciones gastrointestinales a través de la piel, y vía genital.

La persistencia de antibióticos, antiparasitarios y otros fármacos en la leche, ha suscitado muchas preocupaciones, ya que es uno de los productos de origen animal más consumidos por el hombre (Debackere, 1995).

La excreción de los agentes antimicrobianos a través de la leche depende de una serie de factores fisico-químicos, como pH, solubilidad del fármaco en lípidos y unión de éste a las proteínas. A su vez, estos factores pueden verse alterados por la enfermedad y provocar cambios sistémicos o locales en la distribución de dicha sustancia.

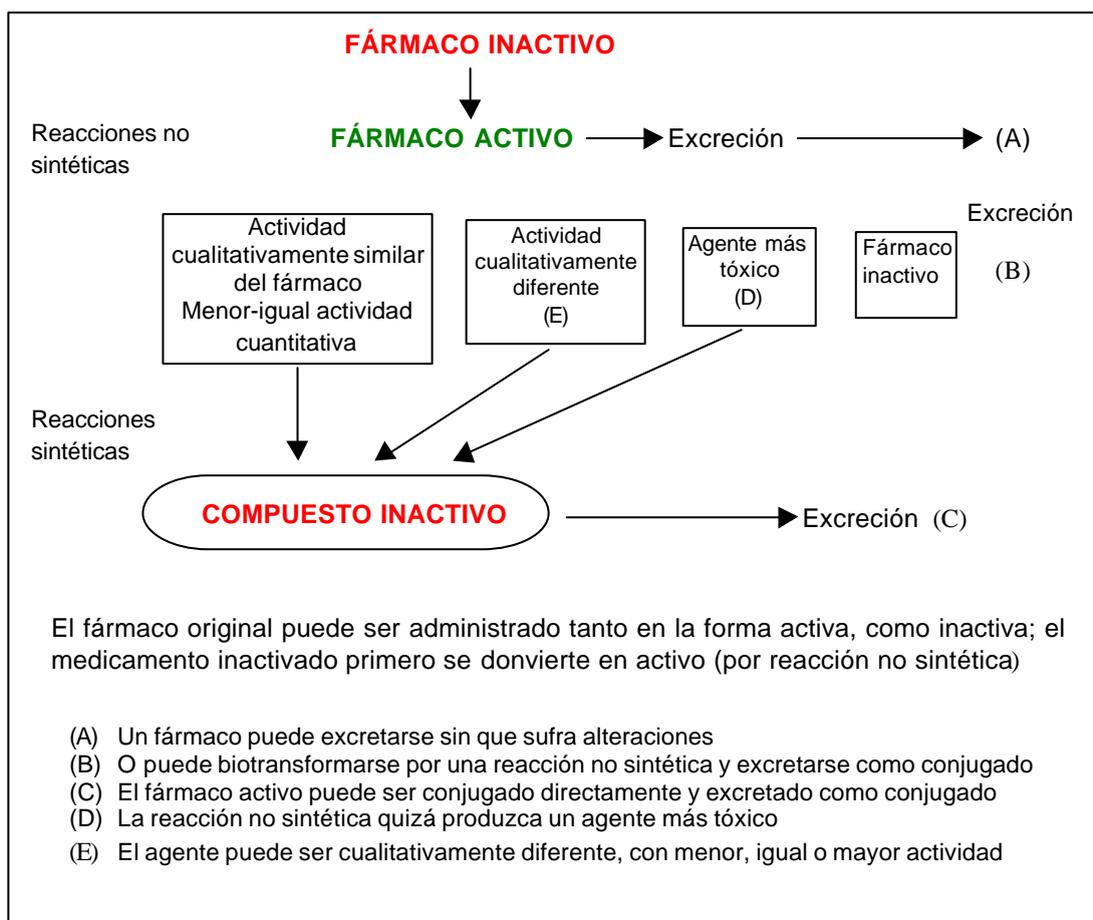


Figura 2. Efecto de la biotransformación corporal de los fármacos en relación con su actividad farmacológica

Fuente: Sumano y Ocampo (1997)

1.3. FACTORES DE VARIACIÓN DE LA PRESENCIA DE RESIDUOS EN LA LECHE

Existen factores inherentes a la aplicación de sustancias farmacológicas que pueden influir tanto en la cantidad como en la duración de los tiempos de excreción y, por tanto, en la presencia de sus residuos en la leche. Según Debackere (1995), estos factores son los siguientes:

- Naturaleza del antibiótico: el carácter ácido o básico del antibiótico puede ser importante para su presencia en la leche, siendo los antibióticos básicos los menos ionizados al pH de la leche (6,6 – 6,8) y se difundirán mucho mejor que los de tipo ácido.
- Dosis administrada: el papel de la dosis es importante, ya que un aumento de ésta parece implicar un alargamiento sistemático de la duración de la eliminación en el caso de los antibióticos inyectados por vía parenteral. En el caso de los productos intramamarios, un incremento de la dosis también puede aumentar la duración de la eliminación pero, en este caso, no suele producirse de un modo sistemático (Archimbault *et al.*, 1980).

- **Influencia del excipiente:** para los medicamentos inyectados por vía parenteral, los excipientes oleosos llevan consigo una eliminación más larga que los excipientes acuosos. En un estudio sobre distintos excipientes, se encontró que cuando se inyectaba un antibiótico con excipiente oleoso, el animal presentaba un aumento de la excreción mayor (125%) que si se le inyectara dicho antibiótico en solución acuosa.

- **Vía de administración:** el cambio de la vía de administración puede modificar la concentración del antibiótico en la leche y la duración de su periodo de eliminación. De forma general se indica que la vía intramamaria, para un mismo producto, presenta unos periodos de eliminación mucho más prolongados que la vía intramuscular, y su concentración en la leche es, también, más elevada.

- **Estado sanitario de la ubre:** el tratamiento contra la mamitis modifica el pH y la composición de la leche; de igual modo, los procesos de filtración entre la sangre y la leche se encuentran alterados, con lo que el paso de antibióticos a la leche puede ser diferente si comparamos animales sanos con enfermos.

Hay que señalar que es importante conocer los factores que pueden influir en la presencia de restos de medicamentos en la leche, con el fin de establecer las medidas de control necesarias para evitar este tipo de contaminación.

De acuerdo al Real Decreto 109/95 de 25 de enero de 1995, se deben utilizar únicamente los medicamentos que han sido sometidos a la Comisión Nacional o Europea de Evaluación, y que estén debidamente registrados y autorizados para su comercialización y utilización. Además es necesario respetar, las condiciones de utilización de acuerdo con las dosis recomendadas por el fabricante, y mantener los tiempos de espera, que se especifican en el medicamento para dichas dosis.

Honkanen-Buzalski y Reybroeck (1995) señalan que el uso de medicamentos fuera de especificaciones de etiquetaje (Extra-Label use) es una de las principales causas de la presencia de residuos en la leche.

Muchos ganaderos no respetan las pautas establecidas en la administración de fármacos, en concreto en lo que se refiere al tiempo de espera, es decir, al período necesario que debe transcurrir tras la última aplicación del medicamento y el aprovechamiento de los alimentos obtenidos del animal tratado.

El tiempo de espera constituye una característica esencial y específica del medicamento para cada tipo de producto (carne, huevos, leche, etc.). Los tiempos de espera basados en los LMR existentes, se determinan después de realizar estudios farmacocinéticos en las condiciones de utilización del medicamento veterinario determinado.

1.4. EFECTOS DE LA PRESENCIA DE RESIDUOS DE MEDICAMENTOS

No hay duda que el uso de la terapia mediante antibióticos ha mejorado significativamente el estado sanitario del ganado lechero. Más particularmente, los tratamientos intramamarios han sido muy efectivos en el caso de las mamitis.

Sin embargo, estos efectos positivos se contrarrestan con el hecho de que se pueden encontrar residuos de medicamentos en la leche de los animales en lactación, incluso varios días después de terminar el tratamiento. Si por alguna razón, esta leche que contiene antibióticos se introduce en el circuito lechero, puede contaminar eventualmente la leche almacenada en el tanque de la granja, en la cisterna de recogida o incluso en los grandes silos.

Por este motivo, dentro de los programas de control de calidad de la leche utilizada como materia prima para obtener productos alimentarios, existe un apartado dedicado a controlar la presencia de residuos de sustancias antimicrobianas, que influyen directamente en la calidad de la misma, tanto por su repercusión sanitaria como tecnológica. Además, hay que añadir un factor económico que afecta considerablemente, a los ganaderos.

El primer aspecto se refiere a la salud pública, ya que es conocido que los antibióticos pueden tener efectos adversos en los seres humanos (Dewney *et al.*, 1991; Currie *et al.*, 1998). Además, estas consecuencias son más graves en aquellos sectores de la población más débiles, como son los ancianos y los niños, ambos tradicionalmente consumidores de productos lácteos. Los principales problemas que se pueden presentar son:

- La presencia de dichos residuos puede causar problemas de sensibilización a los antibióticos producida por una ingestión repetida de pequeñas dosis.
- Los antibióticos pueden provocar en las personas procesos de alergias que pueden, en casos extremos, llevar a la anafilaxia.
- La presencia de residuos de antibióticos provoca perturbaciones pasajeras en la flora intestinal del consumidor.
- Es posible que se produzcan reacciones de intoxicación frente a determinados antibióticos de gran toxicidad.
- Como resultado de la exposición repetida de las bacterias a los agentes antibacterianos, éstas pueden desarrollar genes de resistencia a dichas sustancias y, en consecuencia, resultar ineficaces para el tratamiento de enfermedades.

Es importante señalar que algunas de las sustancias farmacológicas presentes en la leche resisten las altas temperaturas, por lo que pueden llegar al consumidor aún después de haber sido sometidas a tratamientos térmicos en la industria (Jacquet y Auxepaules, 1978; Sullivan *et al.*, 1981; Oda y Hiwaki, 1996), lo que agrava el problema para la salud pública.

Por otra parte, España ocupa el tercer lugar en cuanto a producción de leche de oveja en la Unión Europea que se destina fundamentalmente a la fabricación de queso (99 %) y un porcentaje importante de estos quesos que se elaboran con leche cruda de oveja están acogidos por Denominaciones de Origen Protegidas (Idiazabal, Manchego, La Serena, Roncal, Zamorano), hecho que aumenta la gravedad de la presencia de residuos, incrementando el riesgo para el consumidor al no haber ningún tratamiento térmico que los desnaturalice.

El segundo aspecto, es decir el tecnológico, se refiere al hecho de que los procesos bacterianos en la elaboración de productos fermentados como queso y yogur se ralentizan, pudiendo retrasar la acidificación, dificultar el cuajado y la maduración (Mourot y Loussouarn, 1981; Brady y Katz, 1987, Suhren, 1995), llegando incluso a inhibirse completamente por causa de los residuos de antibiótico, ya que afectan a la flora láctica dando lugar a procesos de mala calidad (Packham *et al.*, 2001). Los daños que producen la presencia de estos residuos dependen de la naturaleza de los antibióticos, su concentración en la leche y el tipo de producto a fabricar (Mäyra-Mäkinen, 1995).

Además, la presencia de bajos niveles de antibióticos en la leche utilizada para la elaboración de queso, puede ser la causa de defectos en su sabor, textura desigual, mal desarrollo y la tendencia a la fermentación del ácido butírico (Goursand, 1991).

Dentro de la industria láctea, el *Streptococcus salivarius* var. *thermophilus* (ST) y el *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (LB) son microorganismos útiles empleados en la fabricación de yogures y de ciertos quesos. El ST es importante como productor de ácido, mientras que la mezcla ST-LB es necesaria para la obtención de una fermentación conveniente. Este equilibrio puede ser destruido por un cierto número de factores, entre los que destacan los inhibidores naturales o artificiales, tales como los antibióticos (Mourot y Loussouarn, 1981).

Del Prato (1997) observa problemas en la elaboración de productos fermentados, ya que el desarrollo del *Streptococcus salivarius* var. *thermophilus* utilizado en la elaboración del yogur se ve dificultado cuando están presentes concentraciones de 500-5.000 µg/kg de estreptomina, 50-100 de cloranfenicol, y 1-10 µg/kg de tetraciclina.

También, la presencia de residuos de antibióticos puede influir en el resultado del recuento total de gérmenes, produciendo interferencias en las pruebas de la reductasa y dando resultados erróneos en el recuento de gérmenes patógenos, falseando así la calidad higiénica de la leche (Moretain, 1996).

Algunos autores, destacan la importancia que tiene la detección presuntiva de estos residuos en la industria, y es por ello que han realizado estudios que mencionan los diferentes métodos de detección existentes en el mercado (Barbosa *et al.*, 2004)

Por último la presencia de residuos en la leche conlleva unas pérdidas económicas para la industria láctea, por fabricaciones de yogur no viables, cubas en las que no se produce el cuajado y deben ser desechadas, fabricación de mantequillas con sabores y aromas anómalos, entre otras.

Tampoco hay que olvidar la importancia que tiene la presencia de residuos para el propio ganadero que puede llevar a una penalización en el precio por parte de la industria. Y lo que es más importante, la prohibición por parte de las autoridades sanitarias de la comercialización de la leche, al ser calificada como “*no apta para consumo humano*” según la Directiva 92/46/CEE.

1.5. MEDIDAS DE CONTROL DE LA PRESENCIA DE RESIDUOS

El hecho de que la detección de residuos se realice siempre “*a posteriori*” y sobre la muestra del tanque en la explotación o de la cisterna del camión, hace necesario que las medidas de prevención y control se realicen en los procesos de tratamientos del ganado y del ordeño para evitar una contaminación en cadena (Zorraquino, 1996).

1.5.1. Medidas preventivas

El sistema preventivo a aplicar recomendado por el Codex Alimentario, y obligatorio para la industria alimentaria (Directiva 93/43/CEE), es la adopción de un sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC) para el control de los residuos de medicamentos en la carne y leche (Zorraquino, 1997).

Actualmente en la propuesta europea de reglamento sobre higiene de los alimentos (COM/2003/33 (01)) se indica textualmente que la higiene de las explotaciones puede organizarse mediante el uso de “Códigos de Prácticas Correctas” ya que por razones prácticas no es viable aplicar el sistema APPCC.

En el Capítulo II del Anexo I del propuesto reglamento se destina a las “Guías de Prácticas Correctas”, también conocidas como “Códigos de Buenas Prácticas”.

Los Códigos de Buenas Prácticas o de Prácticas Correctas aplicados a la producción de leche deben tener en cuenta, según la FIL-FAO (2004), los aspectos que se recogen en la Figura 3 entre los que destacan aquellos relacionados con la sanidad de los animales y los tratamientos que se efectúan en la explotación.

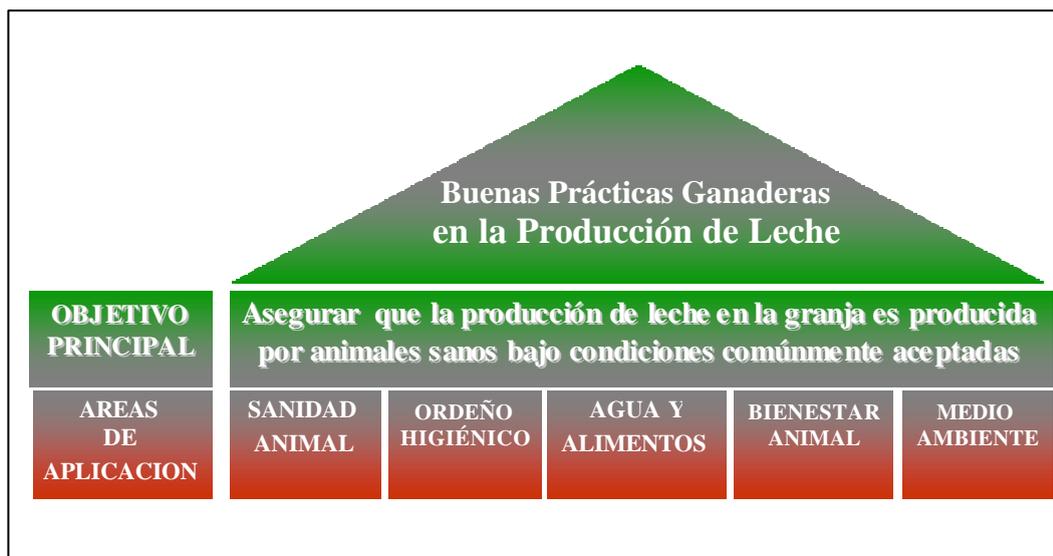


Figura 3. Objetivos y áreas de aplicación de los Códigos de Buenas Prácticas
Fuente: FIL-FAO (2004)

1.5.2. Límites Máximos de Residuos

Como ya se ha comentado anteriormente la administración de medicamentos puede generar residuos en los productos alimenticios obtenidos de los animales tratados. Para proteger a la salud pública es por lo que se han establecido los Límites Máximos de Residuos (LMRs) para los alimentos de origen animal, incluidos la carne, el pescado, la leche, los huevos y la miel.

Los LMRs se basan en el tipo y cantidad de residuo que se considera que no constituye ningún riesgo toxicológico para la salud humana, tal y como expresa la dosis diaria admisible (DDA), o utilizando un factor de seguridad adicional. También pueden tomarse en consideración otros aspectos de salud pública o tecnológicos.

La Unión Europea (UE) divide a los productos de uso veterinario en dos grupos. En el primero se incluyen los medicamentos convencionales (empleados en tratamientos profilácticos, terapéuticos, vacunas y otros productos inmunológicos) y está regulado por la Directiva 2001/82/CEE. El segundo grupo de sustancias estaba regulado hasta el año 2003 por la Directiva 70/524/CEE, esta Directiva incluía las sustancias que se incorporan a los piensos como antibióticos promotores del crecimiento, péptidos, coccidiostáticos, carbadox y olanquidox.

Sin embargo, actualmente esta Directiva ha sido derogada mediante el Reglamento 1831/2003 CEE, sobre el uso de aditivos en la alimentación animal. Este Reglamento, en lo que respecta a antibióticos, prohíbe su utilización como aditivos para alimentación animal (Artículo 5, Apartado 4), admitiendo sólo los coccidiostáticos y los histomonostáticos.

Cada Estado Miembro de la UE podrá establecer sus propias autorizaciones a nivel nacional. Sin embargo, mediante la Directiva 2001/82/CEE, se crea un Comité de medicamentos veterinarios, que facilita la adopción por parte de los Estados miembros de decisiones comunes sobre autorización de medicamentos veterinarios basándose en los criterios científicos de calidad, seguridad y eficacia, y conseguir así la libre circulación de medicamentos veterinarios en la UE.

Dentro de la UE, es muy importante el establecimiento de los Límites Máximos de Residuos (LMRs, en inglés *MRL*). Este establecimiento es competencia del Grupo de trabajo de Seguridad de Residuos del Comité de Medicamentos Veterinarios (CVMP, *del inglés Committee for Veterinary Medicinal Products*). El mecanismo por el cual se regula el establecimiento de los LMRs está legislado en el Reglamento 2377/90/CEE. Según el mismo, a partir de su entrada en vigor, no se podría autorizar el uso de ningún medicamento en ningún Estado Miembro de la UE hasta que no se hubiera establecido su LMR correspondiente.

Por otra parte el Reglamento 2377/90/CEE define el LMR como: *“el contenido máximo concentración de residuos resultante de la utilización de un medicamento veterinario (expresado en mg/kg o g/kg sobre la base del peso en fresco) autorizada en la Comunidad o reconocida como admisible en un producto alimenticio”*

Los LMRs se establecen utilizando el concepto de Ingesta Diaria Aceptable (ADI). El valor ADI indica la cantidad de residuos que una persona puede ingerir diariamente con la alimentación durante toda su vida sin sufrir daño. El mecanismo para el cálculo del LMR es muy parecido al utilizado por el Comité de la FAO/OMS de Aditivos Alimentarios (JECFA). También deben realizarse una serie de complejos estudios toxicológicos, cuya finalidad última es evitar la puesta en el mercado de un producto inseguro (para la especie diana, el medio ambiente, el consumidor o el veterinario).

La Unión Europea ha legislado todas las sustancias farmacológicamente activas que se utilizan en animales productores de alimentos, incluyéndolas en uno de los 4 anexos del Reglamento 2377/90/CEE.

Así, en el Anexo I se incluyen aquellas sustancias en las que se ha establecido el LMR definitivo para uno o más productos animales, en el Anexo II se encuentran aquellas en las que no es necesario establecer su LMR porque se consideran seguras, en el Anexo III las que tienen un LMR provisional (pendiente de más estudios) y en el Anexo IV se incluyen agentes a los que no se les establece LMR porque se considera que son inseguros para el consumidor y su presencia constituye un riesgo para la salud del mismo (cloranfenicol, nitrofuranos, etc.). Las sustancias incluidas en este último anexo están terminantemente prohibidas para uso en animales de producción.

En el Cuadro 1 se indican los diferentes LMRs recogidos en la Legislación Europea, para sustancias quimioterapéuticas y muchos de los antibióticos utilizados en ganado lechero.

Cuadro 1. Límites Máximos de Residuos (LMRs) establecidos por la UE.

Sustancia	LMR	Regla_mento	Leche	Sustancia	LMR	Regla_mento	Leche
<u>Betalactámico</u>				<u>Macrólidos</u>			
Penicilina	4	508/99	Todas	Eritromicina	40	1181/02	Todas
Ampicilina	4	508/99	Todas	Espiramicina	200	508/99	Vaca
Amoxicilina	4	508/99	Todas	Tilmicosina	50	1181/02	Todas
Penetamato	4	508/99	Vaca	Tilosina	50	1181/02	Todas
Nafcilina	30	807/01	Vaca	Lincomicina	150	1181/02	Todas
Cloxacilina	30	508/99	Todas	Pirlimicina	100	2338/00	Vaca
Dicloxacilina	30	508/99	Todas	<u>Aminoglucósidos</u>			
Oxacilina	30	508/99	Todas	Gentamicina	100	868/02	Vaca
Cefacetriilo	125	2162/01	Vaca	Kanamicina	150	2162/01	Vaca
Cefalexina	100	2728/99	Vaca	Neomicina	1500	1181/02	Todas
Cefalonio	20	61/03	Vaca	Espectinomicina	200	1181/02	Oveja
Cefoperazona	50	807/01	Vaca	Estreptomina	200	1530/02	Vaca
Ceftiofur	100	1752/02	Vaca	<u>Quinolonas</u>			
Cefquinoma	20	508/99	Vaca	Danofloxacina	30	1181/02	Vaca
Cefapirina	60	1553/01	Vaca	Enrofloxacina	100	1181/02	Vaca
Cefazolina	50	508/99	Vaca	Flumequina	50	1181/02	Vaca
<u>Tetraciclinas</u>				Marbofloxacina	75	2338/00	Vaca
Doxiciclina	0	-	Todas	<u>Otros</u>			
Clortetraciclina	100	508/99	Todas	Acido clavulánico	200	1553/01	Vaca
Oxitetraciclina	100	508/99	Todas	Bacitracina	100	1478/01	Vaca
Tetraciclina	100	508/99	Todas	Baquiloprim	30	508/99	Vaca
<u>Sulfonamidas</u>				Cloranfenicol	0	-	Todas
Sulfadiazina	100	508/99	Vaca	Colistina	50	1181/02	Todas
Sulfadimetoxina	100	508/99	Vaca	Dapsona	0	-	Todas
Sulfadimina	100	508/99	Vaca	Florfenicol	0	-	Todas
Sulfadoxina	100	508/99	Vaca	Novobiocina	50	2593/99	Vaca
Sulfanilamida	100	508/99	Vaca	Rifaximina	60	508/99	Vaca
Sulfametazina	100	508/99	Vaca	Tianfenicol	50	508/99	Vaca
Sulfatiazol	100	508/99	Vaca	Trimetoprim	50	1181/02	Todas

LMR: µg/kg

2. SUSTANCIAS ANTIMICROBIANAS EN MEDICINA VETERINARIA

2.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS ANTIMICROBIANOS

Las sustancias antimicrobianas han sido utilizadas en el tratamiento de enfermedades del ganado desde poco después de su descubrimiento (Honkanen-Buzalski y Reybroeck, 1997).

Sin embargo, el descubrimiento de la penicilina, en 1928, supuso uno de los hechos más relevantes en la historia de la farmacología, ya que se trataba de una sustancia quimioterapéutica natural para luchar contra los procesos infecciosos. Desde este momento se iniciaron las investigaciones y el desarrollo de los antibióticos (Heeschen y Blüthgen, 1991).

Las propiedades que se buscan en un agente antibacteriano para ser utilizado en el tratamiento de enfermedades infecciosas, se pueden resumir en (Rang *et al.*, 2000):

- Elevada actividad antimicrobiana, eficaz y selectiva; y que no se vea reducida por la biotransformación que sufra en el cuerpo.
- Las características farmacocinéticas deben proporcionar valores en los lugares de acción altos, y ser mantenidos durante tiempos largos.
- Baja toxicidad para el huésped.
- No debe generar resistencias bacterianas.
- Que sea eficaz por vía tópica, oral o parenteral.
- De alta penetrabilidad.
- Que sea estable, no lábil.
- Fácil de producir en grandes cantidades y a bajo coste.

Hay que señalar que encontrar todas las características mencionadas anteriormente en una misma sustancia, es prácticamente imposible, por lo que se recurre a combinaciones de antimicrobianos para mejorar la efectividad de los tratamientos. Sin embargo, no todas las combinaciones de estas sustancias son viables debido a la incompatibilidad química de su estructura (Löscher *et al.*, 1994).

Los antimicrobianos, y dentro de estos los antibióticos, se pueden definir de forma general como un producto del metabolismo microbiano que es capaz de destruir o inhibir el crecimiento de otros microorganismos y además es efectivo a bajas concentraciones (Mateos, 2002). Las sustancias antimicrobianas, se pueden clasificar en:

- **Bacteriostáticos**: son aquellos que inhiben el crecimiento de los microorganismos. Entre estos se encuentran macrólidos, tetraciclinas, cloranfenicol, etc.
- **Bactericidas**: son causantes de la lisis o muerte bacteriana; y en este grupo se incluyen los betalactámicos, aminoglucósidos, polipeptídicos, entre otros.

Por otra parte, existe otra clasificación de los antimicrobianos basada en su eficacia clínica, que está en relación con el espectro de los microorganismos que inhiben:

- Espectro reducido: actúan sobre un número pequeño de gérmenes. Entre ellos se encuentran las penicilinas, las cefalosporinas, los aminoglucósidos y los polipeptídicos.
- Amplio espectro: actúan sobre un gran número de microorganismos. A este grupo pertenecen las tetraciclinas y el cloranfenicol.

2.2. CLASIFICACIÓN DE LAS SUSTANCIAS ANTIMICROBIANAS

La clasificación de las sustancias antimicrobianas se puede realizar de diversas formas y sobre la base de diferentes criterios, como su origen, su modo de acción o su estructura química.

Actualmente, aunque se considera que todos los sistemas de clasificación son válidos, el sistema más utilizado por la comunidad científica es el que agrupa a estos compuestos por similitud química, según los núcleos base de sus estructuras, que les confieren cierta semejanza en sus propiedades físico-químicas y farmacológicas.

En el Cuadro 2 se presenta una clasificación de los agentes antimicrobianos realizada a partir de diferentes autores (Archimbault, 1983; Sumano y Ocampo, 1997; Merck & CO, 2000) en el que el criterio de agrupación ha sido la estructura química de los antimicrobianos.

Por otro lado y de acuerdo con el mecanismo de acción de los agentes antimicrobianos, se pueden clasificar en:

1. Agentes que inhiben la síntesis de la pared celular de la bacteria: antibióticos betalactámicos, bacitracina, etc.
2. Sustancias que afectan la permeabilidad de la membrana celular: polimixinas, etc.
3. Agentes que inhiben la síntesis proteínica a nivel ribosomal: cloranfenicol, tetraciclinas, macrólidos, aminoglucósidos, y otros.
4. Fármacos que afectan el metabolismo de los ácidos nucleicos: rifampicina, etc.
5. Antimetabolitos que impiden la síntesis del ácido fólico, como sulfonamidas, y los nitrofuranos.
6. Inhibidores de la topoisomerasa: quinolonas, fluoroquinolonas, y otras.

Cuadro 2. Clasificación de los diferentes agentes antimicrobianos

Grupos	Familias	Antimicrobianos
Betalactámicos: Poseen en su estructura el anillo betalactámico		
Penicilinas	Naturales	Penicilina G, penicilina V
	Aminopenicilinas Resistentes a β -lactamasas Amplio espectro	Amoxicilina, ampicilina Oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina, nafacilina Ticarcilina, carbencilina
Cefalosporinas	Primera generación	Cefalotina cefapirina, cefalexina, cefadroxil,
	Segunda generación	Cefuroxima, ceforanida, cefamandol, cefoxitina
	Tercera generación	Ceftiofur, ceftriaxona, cefotaxima, cefoperazona
	Cuarta generación	Cefepima, cefquinoma
Otros	Carbapenems	Imipenem
	Monobactamas	Aztreonam
	Acido Clavulánico	
Aminoglucósidos: Consisten en azúcares aminados y un anillo llamado aminociclitol		
	Espectro reducido	Estreptomina, dihidroestreptomina
	Amplio espectro	Neomicina, canamicina, gentamicina, tobramicina
	Diversos	Apramicina
Macrólidos: Poseen en su estructura un anillo latónico con azúcares aminados.		
	Anillo de 12 constituyentes	Sin uso en práctica clínica
	Anillo de 14 constituyentes	Eritromicina, oleandomicina, troleandomicina
	Anillo de 16 constituyentes	Tilosina, espiramicina, josamicina
Quinolonas: Derivados del ácido carboxílico (A.C.)		
	Primera generación	Ácido nalidíxico, Á. pipemídico, Á. oxocínico
	Segunda generación	Flumequina, ciprofloxacina, norfloxacina
	Tercera generación	Enrofloxacin, danofloxacin, sarafloxacin
Tetraciclinas: Tienen en común en su estructura el anillo naftaleno (4 anillos)		
	Acción corta	Tetraciclina, oxitetraciclina, clortetraciclina
	Acción intermedia	Demetilclortetraciclina, metaciclina
	Acción prolongada	Doxiciclina, minociclina
Sulfonamidas: El núcleo básico es p-amino-bencenosulfonamida		
	Uso habitual	Sulfatiazol, sulfametazina, sulfadiazina
	Muy solubles (urinarias)	Sulfisoxazol, sulfasomidina
	Poco solubles (entericas)	Sulfaguanidina, succinilsulfatiazol
	Potenciadas	Sulfonamidas + diaminopirimidinas
	Uso tópico	Sulfacetamida, sulfadiazina de plata
Otros antimicrobianos: Cloranfenicol y derivados, Lincosamidas, Polimixinas, Bacitracinas, Rifamicinas, Nitrofuranos, Nitromidazoles, etc		

Hay que señalar que es probable que surjan categorías adicionales en las clasificaciones, a medida que se descubran mecanismos más complejos.

2.3. PROPIEDADES GENERALES DE LOS ANTIBIÓTICOS

2.3.1. Betalactámicos

El grupo de los antibióticos betalactámicos está formado por las penicilinas y las cefalosporinas, y es el grupo de antibióticos más ampliamente distribuido en la terapia contra la amonitis al igual que sus derivados (Honkanen-Buzalski y Reybroeck, 1995).

Las penicilinas y las cefalosporinas son sustancias relacionadas estructuralmente y en sus mecanismos de acción, difieren en cuanto a su espectro antibacteriano y su farmacocinética.

Las reacciones de hipersensibilidad a estos antibióticos están relacionadas con la presencia de un núcleo activo de los antibióticos betalactámicos, siendo similar su estructura química. Por este motivo resulta necesario proceder con cautela cada vez que se administre algún antibiótico derivado de la cefalosporina a animales o personas sensibles a la penicilina, ya que podrían producirse reacciones de tipo alérgicas (Nouws, 1983).

El radical ácido, unido al grupo amino del ácido 6-aminopenicilánico, es el responsable tanto de la susceptibilidad de la descomposición hidrolítica, como de la actividad antibacteriana de su molécula. Estas dos propiedades químicas influyen en la eficacia de estos fármacos, que depende además de la concentración que alcanzan estos antibióticos en el foco de infección.

En lo que respecta al mecanismo de acción de los antibióticos betalactámicos, debe destacarse el papel principal de impedir la formación de la pared de la célula bacteriana inhibiendo la actividad de las transpeptidasas, enzimas que catalizan la formación de los enlaces peptídicos cruzados en la fase de unión de los polímeros de glucopéptido de la pared celular.

Las bacterias "gram positivas" y "gram negativas" presentan diferente sensibilidad a los antibióticos betalactámicos, dependiendo de las diferencias que existen en sus sitios receptores y de la cantidad relativa de peptidoglucano presente en su pared celular, siendo mayor en las bacterias "gram positivas" que en las "gram negativas".

En la Figura 4 se presenta la fórmula estructural de los antibióticos betalactámicos, donde R_1 y R_2 son los diferentes radicales que se indican en el Cuadro 3 para algunos antibióticos betalactámicos.

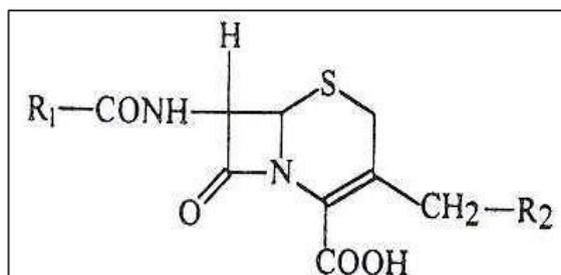


Figura 4. Fórmula estructural de los antibióticos betalactámicos
Fuente: Rang *et al.* (2000)

Cuadro 3. Radicales más comunes de algunos antibióticos betalactámicos

Fármacos	R1	R2
Ampicilina		-H
Cloxacilina		-H
Penicilina		-H
Amoxicilina		-H

2.3.1.1. Penicilinas

En 1928, Alexander Fleming descubrió la penicilina al observar cómo una placa donde crecían estafilococos se había contaminado con un hongo del género *Penicillium*, y como consecuencia de ello, se había inhibido el crecimiento bacteriano alrededor del hongo. Al aislar dicho hongo, se determinó la producción de una sustancia con propiedades antibacterianas, pero no fue hasta 1940, cuando Florey y Chain purificaron dicho compuesto y analizaron sus propiedades quimioterapéuticas en ratones infectados. En 1941, sus efectos antibacterianos fueron demostrados en humanos, además, se observó la ausencia de efectos tóxicos.

De este modo se descubrieron unas sustancias que revolucionaron el campo de la medicina en el tratamiento de enfermedades infecciosas: los antibióticos.

Todas las penicilinas derivan del ácido 6-aminopenicilánico, que consiste en un anillo tiazolidina (A) unido a un anillo betalactámico (B). Este último anillo lleva un grupo amino secundario. Los sustituyentes de la cadena lateral en R₁

determinan las principales características antibacterianas de cada penicilina en particular. En la Figura 5 se presenta la estructura química del núcleo de las penicilinas, así como los radicales que dan origen a algunas de las penicilinas sintéticas más importantes.

Las penicilinas naturales se obtienen a partir del cultivo del hongo *Penicillium notatum* y del *Penicillium chrysogenum*. Las penicilinas semisintéticas se preparan en el laboratorio utilizando como materia prima el ácido 6-aminopenicilánico producido con el cultivo de *Penicillium*.

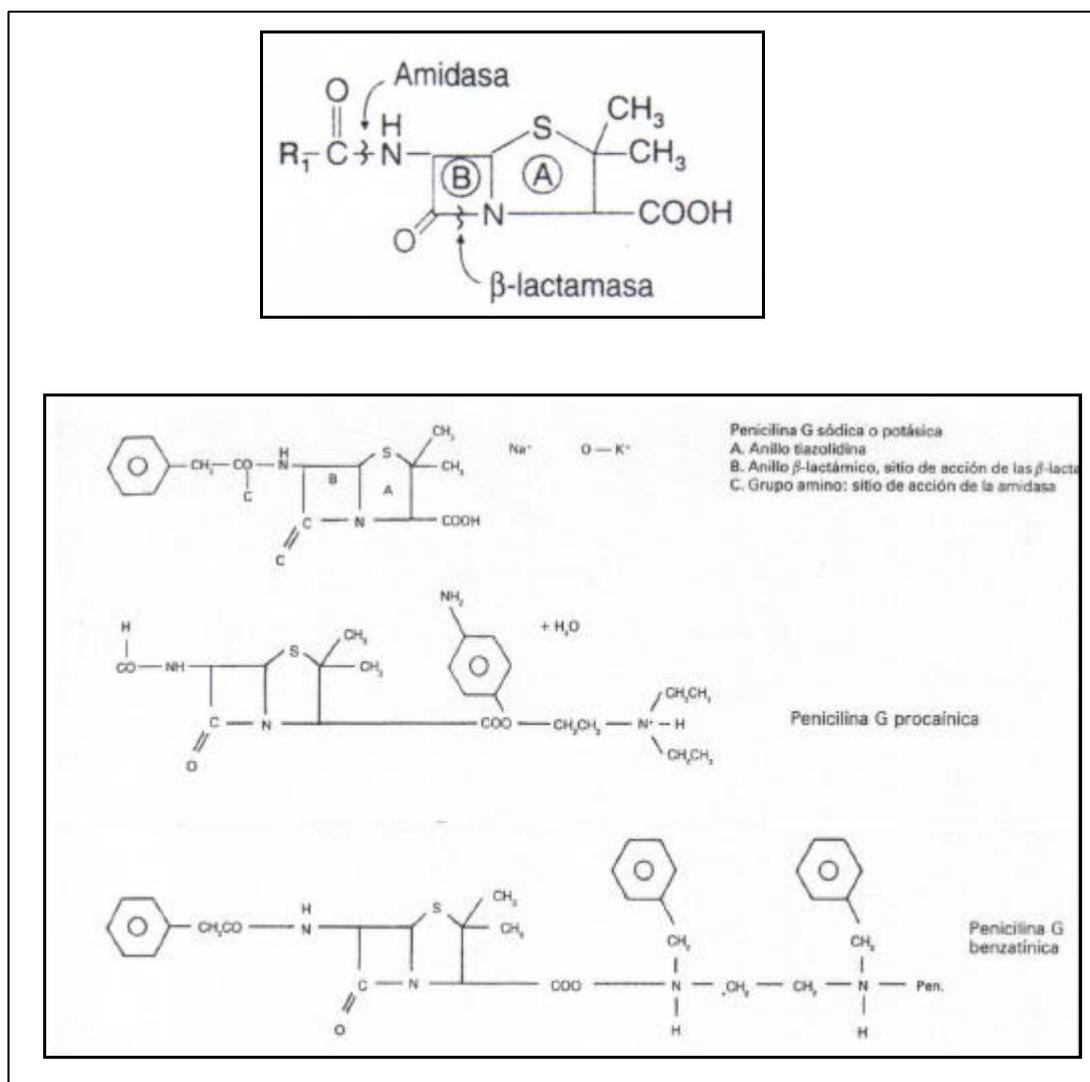


Figura 5. Núcleo de la penicilina y radicales que originan penicilinas sintéticas
Fuente: Rang *et al.* (2000)

Las penicilinas son algo inestables: son sensibles al calor, a la luz, al pH extremo, a los metales pesados y a los compuestos oxidantes y reductores. También suelen deteriorarse en solución acuosa, por lo que deben reconstituirse inmediatamente antes de inyectarse. Las penicilinas son ácidos orgánicos débiles poco solubles, que se administran por vía parenteral, tanto en suspensión acuosa u oleosa, como en forma de sales hidrosolubles.

Se aceptan varias subclasificaciones de las penicilinas, basadas principalmente en las diferencias en su espectro antibacteriano. En el Cuadro 4 se presenta una clasificación de estas sustancias según la última edición del Manual Merck de Veterinaria (Merck & CO, 2000).

La mayoría de penicilinas en disolución acuosa se absorben rápidamente a partir de los lugares de inyección parenteral. Cuando se administran por vía oral, el grado de absorción es variable, dependiendo de su estabilidad en ácido y de su adsorción en la comida. Se distribuyen ampliamente por los líquidos y tejidos corporales al ser insolubles en lípidos, no entran en las células de los mamíferos (Rang *et al.* 2000).

Cuadro 4. Clasificación de las penicilinas según su espectro de acción

Fármaco	Actividad antibacteriana
<i>Penicilina naturales</i>	
Penicilina G y sus sales	Microorganismos gram positivos y algunos gram negativos (<i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Pasteurella</i>)
<i>Aminopenicilinas</i>	
Ampicilina Amoxicilina Tircarcilina Carbencilina	Microorganismos gram positivos (menos activas que la penicilina G). También contra microorganismos gram negativos: <i>Escherichia</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> ; pero no contra estafilococos productores de penicilinas.
<i>Penicilinas resistentes a betalactamasa</i>	
Cloxacilina Dicloxacilina Oxacilina Nafacilina	Penicilinas producidas por cepas de estafilococos.
<i>Penicilinas potenciadas</i>	
Amoxicilina-clavulanato-potásico	Amplio espectro

Fuente: Merck & CO (2000)

2.3.1.2. Cefalosporinas

Las cefalosporinas son antibióticos betalactámicos que se obtienen semisintéticamente a partir de los cultivos de *Cephalosporium acremonium*. Su estructura fundamental es el ácido aminocefalosporánico, que les confiere el carácter de ácidos débiles.

En la Figura 6 se muestra la estructura química del núcleo de las cefalosporinas, así como las formulas estructurales de algunas de estas sustancias de importancia en medicina veterinaria.

Las propiedades físicas y químicas de las cefalosporinas son similares a las de las penicilinas, aunque son algo más estables frente a cambios de pH y temperatura. Se usan en forma de base libre para administración oral si son estables en medio ácido, o como sales de sodio en solución acuosa para administración parenteral (Merck & CO, 2000).

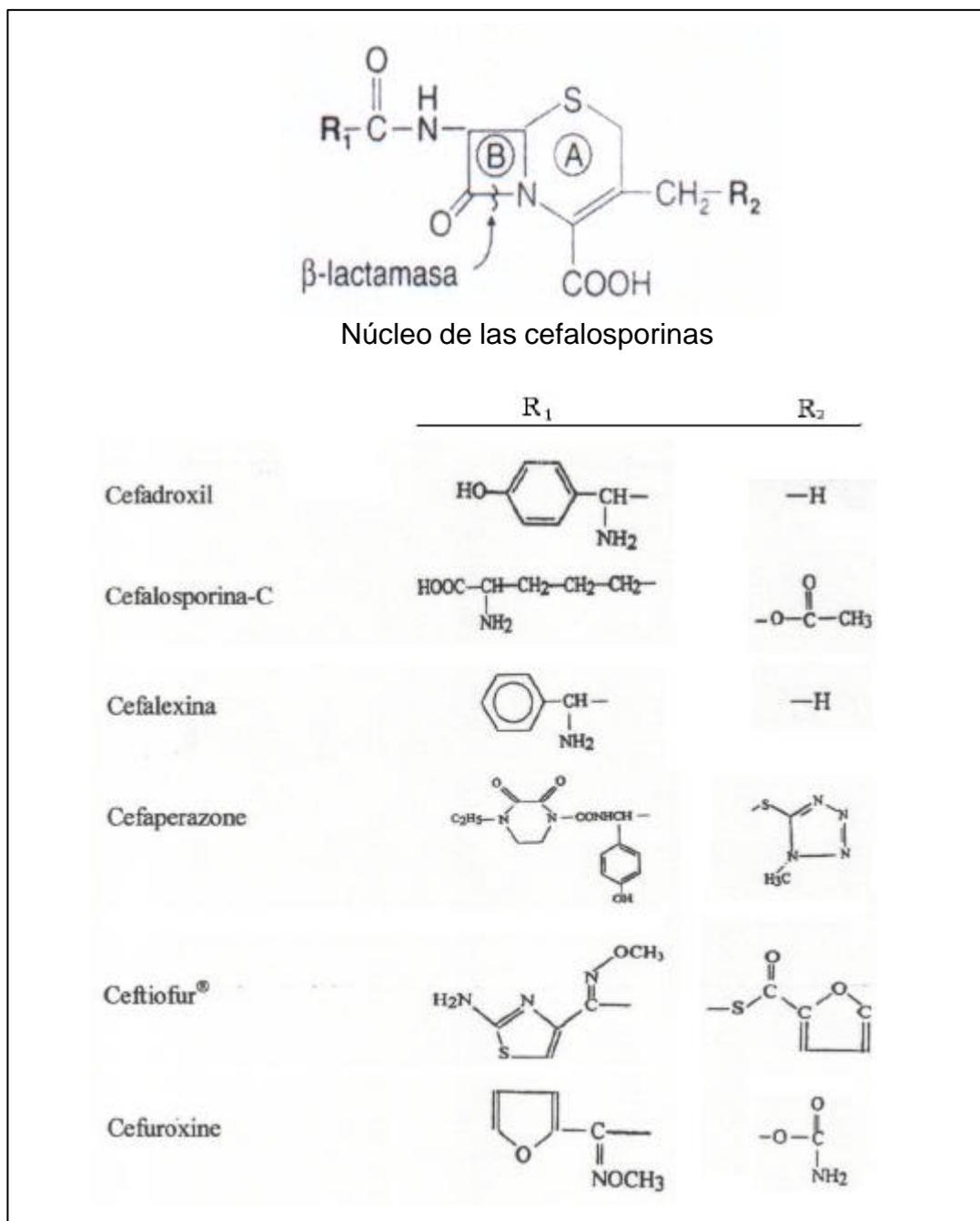


Figura 6. Estructura química del núcleo de las cefalosporinas y algunos radicales de las más importantes

Fuente: Sumano y Ocampo (1997) y Rang *et al.* (2000)

En el Cuadro 5 se presenta una clasificación de las cefalosporinas en base a su espectro de acción antimicrobiana.

Cuadro 5. Clasificación y espectro de las cefalosporinas

Clasificación	Actividad antimicrobiana
Primera generación	
Cefadroxil	Son las de mayor actividad contra gram positivos y gram negativas, como <i>Pasteurella</i> y <i>Salmonella</i> . Muchas bacterias anaerobias también son sensibles. Son resistentes especies de <i>Entobacter</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Sctinobacter</i> , <i>Proteus</i> y <i>Pseudomonas</i>
Cefalexina	
Cefazolina	
Cefapirina	
Cefalotina	
Segunda generación	
Cefamandol	Igual o menos eficacia que las de primera generación contra gram positivos, pero más contra gram negativas. El uso de estos antibióticos se reserva para infecciones resistentes a las cefalosporinas de primera generación
Ceforanida	
Cefoxitina	
Cefuroxima	
Tercera generación	
Ceftiofur	Son las más eficaces contra gram negativas resistentes y las menos eficaces contra gram positivos Son las más eficaces contra <i>Pseudomonas aeurogenosa</i>
Cefoperazona	
Cefotaxima	
Ceftriaxona	
Cuarta generación	
Cefepima	Acción contra gram positivos y gram negativas (especies de <i>Pasteurella</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Enterobacter</i> ,...)
Cefquinoma	

Fuente: Sumano y Ocampo (1997)

2.3.2. Aminoglucósidos

Los aminoglucósidos son antibióticos bactericidas de espectro relativamente amplio con actividad frente a las bacterias aeróbicas y micoplasmas.

Desde el punto de vista químico, los antibióticos pertenecientes al grupo de los aminoglucósidos son bases orgánicas polares. Esta polaridad es la responsable de que gran parte que todos los antibióticos de este grupo tengan propiedades farmacocinéticas parecidas.

En lo que respecta al mecanismo de acción, una vez que el aminoglucósido ha pasado al interior de la célula, se une a un receptor existente en unas subunidades de los ribosomas, induciendo la lectura errónea del código genético del molde del ácido ribonucleico mensajero (RNAm). Como consecuencia de ello se inhibe la síntesis de las proteínas ribosómicas.

La actividad antimicrobiana de los aminoglucósidos está dirigida principalmente contra las bacterias aeróbicas "gram negativas", mientras que su acción contra las bacterias "gram positivas" es limitada.

Dentro de los aminoglucósidos los más utilizados para terapéutica veterinaria son: estreptomycin, gentamicina, kanamicina y neomicina, éstos se presentan con más detalle a continuación y quedan reflejados en la Figura 7.

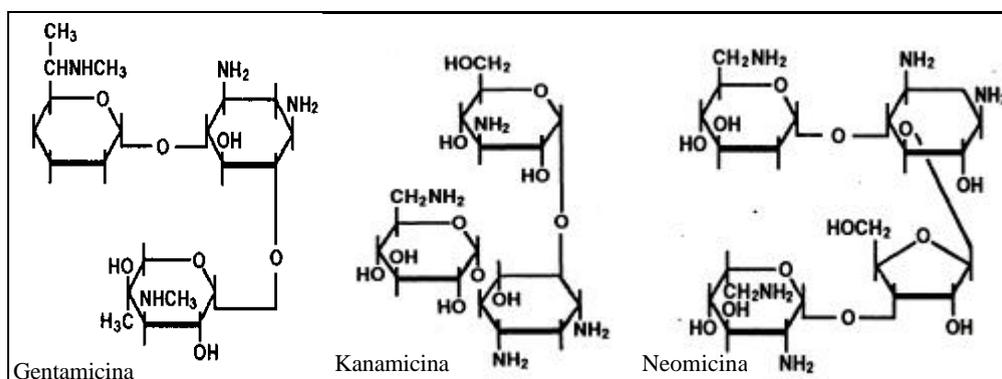


Figura 7. Estructura química de antibióticos aminoglucósidos

Fuente: Rang *et al.* (2000)

Los aminoglucósidos se clasifican según su espectro de acción en:

- *Agentes de espectro reducido.* La estreptomycin y la dihidroestreptomycin, activas frente a bacterias aerobias gram negativas.
- *Agentes de amplio espectro.* La neomicina, framicitina, paramomicina y kanamicina poseen espectros más amplios incluyendo bacterias gram positivas y muchas aerobias gram negativas. La gentamicina, tobramicina, amikacina y netilmicina tienen espectros que se extienden a *Pseudomonas aeruginosa*.
- *Agentes diversos.* Aminoglucósidos con estructuras atípicas como la apramicina y la espectinomycin pero con similar mecanismo de acción y espectro antibacteriano.

Los aminoglucósidos inhiben la síntesis de proteínas bacterianas. Su efecto es bactericida y se usan ampliamente contra microorganismos gram negativos entéricos.

2.3.3. Macrólidos

El grupo de los macrólidos se constituye en un conjunto de compuestos estrechamente emparentados que se caracterizan por poseer un anillo lactónico macrocíclico al cual están unidos azúcares. Los miembros del grupo incluyen principalmente a la eritromycin (Figura 8), carbomicina, espiramicina, tilosina y lincomycin entre otros.

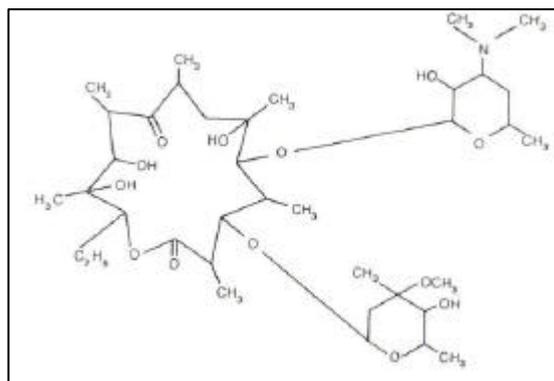


Figura 8. Fórmula estructural de la eritromicina
Fuente: Rang *et al.* (2000)

Los macrólidos se diferencian en tres clases según el tamaño del anillo de lactona (Merck & CO, 2000):

- Anillos con 12 constituyentes: no se usan en la práctica clínica.
- Anillos con 14 constituyentes: eritromicina y los compuestos estrechamente relacionados como la oleandomicina y troleandomicina.
- Anillos con 16 constituyentes: espiramicina, josamicina y tilosina de uso práctico clínico.

El mecanismo antimicrobiano parece ser el mismo para todos los miembros del grupo. Interfieren con la síntesis proteica al unirse reversiblemente a la subunidad 50S del ribosoma. Los macrólidos se consideran compuestos bacteriostáticos pero, en concentraciones elevadas, la eritromicina es bactericida.

Los macrólidos son activos frente a la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias gram negativas, aunque hay variaciones considerables con respecto a su potencia y actividad. Se suelen considerar un tratamiento alternativo seguro y eficaz a las penicilinas. Las indicaciones generales incluyen infecciones de las vías respiratorias superiores, bronconeumonía, enteritis bacteriana, metritis, piodermatitis, infecciones urinarias, artritis y otras.

2.3.4. Quinolonas

Las quinolonas y fluorquinolonas son el grupo farmacológico de mayor desarrollo en la actualidad. Las disponibles presentan una estructura quinolónica común que se puede apreciar en la Figura 9. Los distintos sustituyentes químicos y cadenas laterales son los responsables de las diferentes características físicas de cada fármaco. A su vez, en el Cuadro 6 se representan algunos de los radicales más comunes que dan lugar a algunos de los principales compuestos.

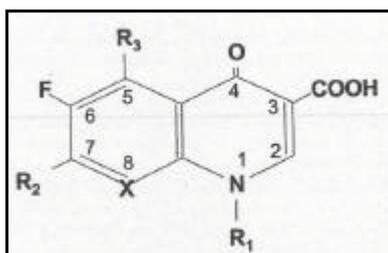


Figura 9. Estructura básica de las quinolonas
Fuente: Rang *et al.* (2000)

Cuadro 6. Radicales más comunes de las principales quinolonas

Quinolonas	R1	R2	R3
Enrofloxacin			-H
Ciprofloxacin			-H

En el Cuadro 7 se incluye una clasificación de las principales quinolonas de cada generación, como se indica en dicho cuadro se distinguen tres generaciones con potencia antibacteriana y rasgos farmacológicos progresivamente mejores.

Las quinolonas son compuestos normalmente bactericidas. Actúan inhibiendo el ADN-girasa bacteriano que es responsable del superenrollamiento del ADN con la consiguiente alteración de su conformación espacial. Están indicadas en el tratamiento de infecciones locales y sistémicas causadas por microorganismos sensibles, especialmente por patógenos intracelulares.

Cuadro 7. Clasificación y espectro de acción de las quinolonas

Quinolonas	Espectro
1ª generación	
Ácido nalidíxico Ácido pipemídico Ácido oxocínico	Espectro reducido. Solo gram negativos.
2ª generación	
Flumequina Ciprofloxacina Norfloxacina	Amplio espectro. Actividad contra <i>E.Coli</i> , <i>Pasteurella Pseudomonas</i> , <i>Legionella</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Ureaplasma</i> , <i>Hemophilus</i> , <i>Staphylococcus</i> , etc.
3ª generación	
Enrofloxacin Danofloxacin Sarafloxacin	Amplio espectro. Activas frente a todas las bacterias mencionadas y contra especies de <i>Brucilla</i> , <i>Rickettsia</i> , <i>Coxiella burnetti</i> , y <i>Plasmodium Falciparum</i> . Actividad menor contra <i>Streptococcus</i> y anaerobios.

Fuente: Sumano y Ocampo (1997); Merck & CO (2000)

2.3.5. Tetraciclinas

Las tetraciclinas son antibióticos producidos por el género *Streptomyces*, de amplio espectro con características antimicrobianas similares, aunque difieren algo entre sí en cuanto a sus espectros y distribución farmacocinética.

Su estructura química se representa en la Figura 10 donde R, R₁ y R₂ son los radicales que dan lugar a los diferentes compuestos, y en el Cuadro 8 se indican las tetraciclinas más importantes con sus radicales correspondientes.

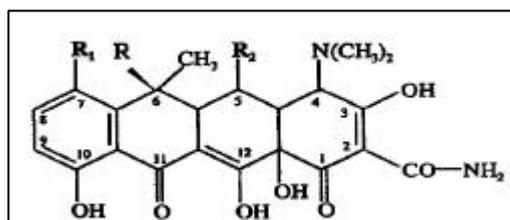


Figura 10. Estructura química del núcleo de las tetraciclinas
Fuente: Rang *et al.* (2000)

Cuadro 8. Radicales de las tetraciclinas más importantes

Tetraciclinas	R	R ₁	R ₂
Clortetraciclina	-Cl	-CH ₃	-H
Oxitetraciclina	-H	-CH ₃	-OH
Tetraciclina	-H	-CH ₃	-H

La clasificación atendiendo a la naturaleza del compuesto, divide a las tetraciclinas en los siguientes grupos:

- *Tetraciclinas naturales*: oxitetraciclina, clortetraciclina y dimetil-clortetraciclina.
- *Derivados semisintéticos*: tetraciclina, rolitetraciclina, metaciclina, minociclina, doxiciclina, limeciclina y otras.
- Por otra parte, basándose en los tiempos de eliminación de estos antibióticos, se clasifican en:
 - *Compuestos de acción corta*: tetraciclina, oxitetraciclina, clortetraciclina
 - *Compuestos de acción intermedia*: dimetil elortetraciclina y metaciclina
 - *Compuestos de acción prolongada*: doxiciclina y minociclina

Las tetraciclinas generalmente son bacteriostáticas y para que sean eficaces resulta esencial la respuesta del sistema inmunitario del huésped. En concentraciones elevadas, como las que pueden alcanzarse en la orina, estos compuestos resultan bactericidas.

Se usan para tratar infecciones sistémicas como enteritis bacterianas, metritis, mamitis, etc y locales como la queratoconjuntivitis infecciosa en ganado bovino, la clamidosis y la actinobacilosis entre otras enfermedades específicas.

2.3.6. Sulfonamidas

Las sulfonamidas fueron los primeros agentes quimioterapéuticos eficaces que se emplearon sistemáticamente en la prevención y cura de las infecciones bacterianas (Sumano y Ocampo, 1997).

La mayor parte de las sulfonamidas útiles en quimioterapia son derivados de la sulfanilamida. Todas tienen el mismo núcleo, al que se van añadiendo o sustituyendo varios grupos funcionales al grupo amido. Estos cambios originan compuestos con distintas propiedades físicas, químicas, farmacológicas y antibacterianas.

A continuación se representa en la Figura 11 la fórmula estructural básica de las sulfonamidas y en el Cuadro 9 algunos radicales que dan lugar a algunas de las sulfonamidas más importantes de uso veterinario.

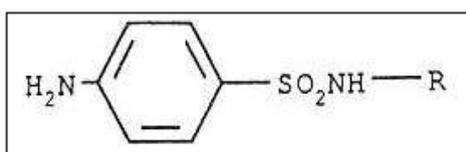
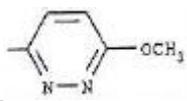
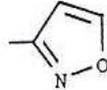
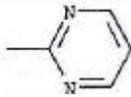


Figura 11. Fórmula estructural básica de las sulfonamidas
Fuente: Rang *et al.* (2000)

Cuadro 9. Radicales de algunas sulfonamidas

Sulfonamidas	-R
Sulfadiazina	
Sulfametoxazol	
Sulfaquinoxalina	

Las distintas sulfonamidas y derivados de sulfonamidas pueden clasificarse en varios grupos, basados principalmente en sus indicaciones y en la duración de su acción en el organismo. En el Cuadro 10 se muestra una clasificación de acuerdo a dichos criterios.

Cuadro 10. Clasificación de las sulfonamidas

Tipos de sulfonamidas
Uso habitual Sulfatiazol, sulfametacina, sulfapiridina, sulfadimetoxina, etc.
Muy solubles, empleadas en infecciones urinarias Sulfisoxazol, sulfasomidina, etc.
Poco solubles, empleadas en infecciones entéricas Talilsulfatiazol, succinilsulfatiazol, salicilazosulfapiridina, etc.
Potenciadas Trimetoprim/sulfadiacina, trimetoprim/sulfametoxazol, trimetoprim/sulfadoxina, ormetoprim/sulfadimetoxin, etc.
Uso tópico Sulfacetamina para uso oftalmológico, mafenida y sulfadiacina para quemaduras, sulfatiazol para heridas, etc

Fuente: Merck & CO (2000)

Las sulfonamidas tienen efecto bacteriostático, aunque con las concentraciones elevadas que pueden darse en la orina el efecto puede ser bactericida. Inhiben las bacterias "gram negativas" y "gram positivas", algunas *Chlamydias*, *Nocardia*, *Actinomyces* spp, y algunos protozoos. Las más activas pueden actuar frente varias especies de *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Salmonella*, *Pasteurella* e incluso *E.Coli*.

Normalmente se usan para tratar o evitar enfermedades sistémicas o locales. Entre las infecciones que se tratan están, la coccidiosis, mastitis, metritis, colibacilosis, poliartritis, infecciones respiratorias y toxoplasmosis.

2.3.7. Otros agentes antimicrobianos

En este apartado se indican algunas sustancias comúnmente utilizadas en la terapéutica veterinaria.

En cuanto al cloranfenicol se considera que es un potente inhibidor de la síntesis de las proteínas en los microorganismos, inhibe la síntesis proteica en las mitocondrias de las células de la médula ósea de los mamíferos.

El cloranfenicol ejerce una acción bacteriostática frente a la mayoría de las bacterias "gram positivas", y frente a muchas "gram negativas", también puede comportarse frente a algunos microorganismos como bactericida. El cloranfenicol fue uno de los fármacos de elección en el tratamiento de la mastitis por coliformes antes de que su empleo se restringiera, actualmente la Unión Europea, ha prohibido su uso.

Respecto al trimetoprim hay que mencionar que es un derivado sintético de la diaminopirimidina, que actúa inhibiendo la síntesis del ácido tetrahidrofólico, y que cuando se asocia con sulfonamidas se produce un efecto sinérgico y bactericida. Es un fármaco bacteriostático de amplio espectro, activo frente a las bacterias aeróbicas "gram positivas" y "gram negativas", pero normalmente carece de actividad frente a las bacterias anaerobias.

Por último otros antimicrobianos destacados son las lincosamidas, polioxinas, bacitracinas y nitrofuranos. Dentro de las lincosamidas, algunas de las más empleadas son la lincomicina y la pirlimicina. Ambas se emplean en el tratamiento de mastitis clínica y subclínica por vía intramamaria en vacuno, ovino y caprino.

En lo que se refiere a las polimixinas cabe señalar que, son antibióticos polipeptídicos, entre los que podemos destacar, la polimixina B y la colistina. Su acción está dada casi exclusivamente contra bacterias "gram negativas", siendo su empleo primordial contra mastitis.

A su vez las bacitracinas se suelen emplear de modo sinérgico con las polimixinas, actuando por tanto contra bacterias "gram negativas".

Y por último comentar que la actividad principal de los nitrofuranos, se lleva a cabo en contra de bacterias "gram negativas" y algunas "gram positivas". Los más empleados en la medicina veterinaria son: furazolidona, nitrofurazona y nitrofurantoína. Actualmente, existe una gran controversia respecto a su uso, puesto que algunos estudios afirman que pueden generar derivados cancerígenos, y su empleo ha sido limitado.

3. MÉTODOS DE DETECCIÓN DE RESIDUOS DE ANTIMICROBIANOS EN LA LECHE

3.1. GENERALIDADES

El control de la presencia de residuos antibióticos en la leche está regulado por la Directiva 96/23/CE de 29 de abril de 1996, que establece que los Estados Miembros de la UE deberán controlar la presencia de residuos antibióticos y de otros medicamentos veterinarios en la leche dentro de un Plan Nacional de Vigilancia de residuos de carácter anual.

Para supervisar el correcto funcionamiento de los Planes de control, la UE ha designado cuatro Laboratorios de Referencia (Directiva 96/23/CE) además de los correspondientes Laboratorios Nacionales de cada Estado Miembro.

Por otro lado, la Directiva 92/46/CEE, establece las normas sanitarias aplicables a la producción y comercialización de leche cruda, leche tratada térmicamente y productos lácteos. En su Artículo 15 señala que, se deberán detectar la existencia de residuos en sustancias incluidas en el Anexo IV del Reglamento CEE 2377/90 (antibióticos, antihelmínticos, antiinflamatorios no esteroideos, organoclorados y PCBs, organofosforados, metales pesados y micotoxinas).

Los diversos métodos para la detección de residuos en leche se empezaron a utilizar alrededor de los años 50, especialmente en leche cruda (Bishop y White, 1984). Principalmente se basaban en pruebas de inhibición microbiana como la de difusión en agar, en la inhibición de la producción de ácido o en la inhibición de la coagulación de cultivos iniciadores (Mitchell *et al.*, 1998).

Desde esa época 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 receptores proteicos/microbianos que han reducido los tiempos de ensayo a escasos minutos. Las últimas tecnologías han integrado las técnicas inmunoenzimáticas con aplicaciones electrónicas dando como resultado métodos basados en biosensores de alta especificidad y sensibilidad, y que ofrecen un futuro prometedor dentro del campo de la detección de residuos en alimentos.

Estos avances han sido el resultado de numerosas investigaciones que han buscado principalmente la creación de un método de detección ideal. Los principales requisitos que debe reunir un método para que resulte apropiado y útil, según Suhren (1995), son los siguientes:

- Sensibilidad elevada frente a las sustancias inhibidoras, especialmente hacia aquellos antibióticos que se utilizan para el tratamiento sanitario de vacas lecheras.
- Precisión y repetibilidad elevadas.

- Incidencia de resultados " falso positivos" baja, ya que los fallos del método conducen a investigaciones considerables y consecuencias negativas para el productor.
- Fácil ejecución e interpretación.
- Bajos costes por muestra.

También para Botsoglou y Fletouris (2001) se requieren métodos prácticos y eficaces, que puedan detectar cualquier sustancia medicamentosa de forma rutinaria, cuantificar de forma fiable e identificar de forma no ambigua los residuos presentes en la leche.

En la actualidad, no se dispone de métodos que cumplan estos atributos para todas las sustancias antimicrobianas, debido principalmente al vasto número de residuos que se pueden encontrar a lo largo de la cadena alimentaria.

El problema de analizar residuos en la leche es complejo, ya que no se sabe cuándo existe un residuo, y si existe se desconoce el tipo y la cantidad del mismo. Así, se dispone de una gran variedad de métodos y esto implica una gran variabilidad de resultados por lo que se tratan de estandarizar para poderlos utilizar rutinariamente en el control de calidad.

La estrategia analítica para detectar el mayor número de sustancias antimicrobianas en la leche se debe basar en combinar las metodologías existentes según el objetivo planteado.

En la Figura 12 se expone un sistema integrado de detección y control de residuos de antibióticos y sulfonamidas basado en el propuesto por Honkanen-Buzalski y Reybroeck (1997), En este sistema se propone una primera etapa en la que se realizaría un control "primario" o de cribado más general mediante un método microbiológico, cualitativo, rápido y económico cuyo único requisito sería garantizar la ausencia de antimicrobianos o la posible presencia por encima de los LMRs. A continuación se establecería una segunda etapa donde se procede a la verificación y cuantificación de los residuos por diferentes métodos analíticos.

En el Boletín nº 258 de la Federación Internacional de Lechería (FIL, 1991) se presenta una recopilación de las características (principio, sensibilidad, niveles de detección, metodología, etc.) de un número de métodos comercializados para el análisis de la leche. En los últimos años se han desarrollado otros métodos, basados en principios diferentes que no se encuentran recogidos en el citado Boletín y que han sido recopilados recientemente por Zorraquino *et al.* (2003).

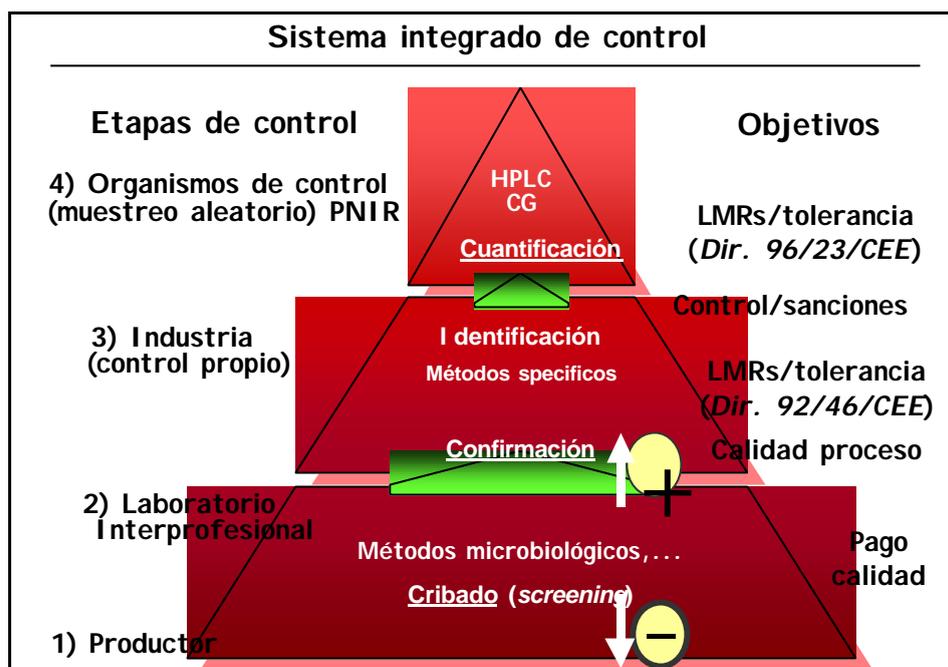


Figura 12. Sistema integrado de control de la presencia de residuos

La Decisión 2002/657/CEE de 12 de agosto de 1996, establece que los métodos de control deben dividirse en dos grupos, métodos de cribado y métodos de confirmación. Los métodos de cribado son los que se usarán para detectar la presencia de una sustancia, o grupo de sustancias, al nivel de interés, de manera que se permita trazar un elevado número de muestras. Los métodos de confirmación proporcionarán información total o complementaria que permita identificar y en su caso, cuantificar de manera inequívoca la sustancia al nivel de interés.

Otros autores (FIL, 1991; Codex Alimentarius, 1996) clasifican los métodos según la etapa de control en la que se emplean. Así se establecen tres categorías: cribado, confirmación y cuantificación.

Actualmente, los métodos empleados deberán estar documentados y cumplir los criterios de funcionamiento, requisitos y procedimientos de los métodos señalados en el Apartado 2, del Anexo I, de la Decisión 2002/657/CE; y haber sido validados de acuerdo con los procedimientos que se describen en el Apartado 3 del citado anexo.

Hay que señalar que los laboratorios lactológicos utilizan estos métodos para evaluar fundamentalmente la calidad de la leche de vaca. En el caso específico de la leche de oveja, los métodos utilizados para la determinación de residuos de antibióticos y sulfonamidas son los mismos que los empleados para la leche de vaca, habiéndose llevado a cabo escasas evaluaciones de cómo se adaptan estos métodos analíticos a la especie ovina.

3.2. CLASIFICACIÓN DE LOS MÉTODOS DE DETECCIÓN DE RESIDUOS

3.2.1. Métodos de cribado o “screening”

Los métodos de cribado deben ser el primer paso dentro de un programa de control de residuos. Se trata de métodos cualitativos, cuya finalidad es establecer la presencia o ausencia de residuos por encima de los límites máximos permitidos (LMRs). Así, un método de cribado debe proporcionar una fiable y precisa indicación de que el analito de interés no está presente en una muestra a niveles inseguros o ilegales (Botsoglou y Fletouris, 2001).

Generalmente, se trata de métodos inespecíficos, lo que los hace ideales para la detección de un amplio rango de sustancias simultáneamente. Sin embargo, esta inespecificidad no permite identificar de forma inequívoca una sustancia, ni cuantificar los niveles a los que se presenta en las muestras analizadas.

Entre las técnicas de cribado, existen en el mercado diferentes tipos de métodos microbiológicos, enzimáticos, de receptores, etc., que permiten detectar de forma rápida la presencia de residuos de antibióticos y sulfonamidas en leche (Cullor, 1992; Cullor *et al.*, 1992; Heeschen, 1993; Cullor *et al.*, 1994).

Los métodos de inhibición del crecimiento microbiano fueron el primer sistema de detección de residuos antimicrobianos desarrollado en alimentos. Originalmente se desarrollaron para uso clínico, y entre los años 1945 y 1948 comenzaron a utilizarse para la detección de residuos en la leche, empleándose posteriormente muchos de estos métodos.

Existen numerosas revisiones bibliográficas que describen la mayor parte de las técnicas microbiológicas empleadas para la detección de residuos en leche hasta la actualidad (Bishop y White, 1984; Mitchell *et al.*, 1998; Botsoglou y Fletouris, 2001; Zorraquino *et al.*, 2003).

Los métodos microbiológicos, se basan en la detección de la inhibición del crecimiento de microorganismos sensibles a los residuos antimicrobianos que pueda presentar la leche u otros tejidos. Aprovechan fundamentalmente la capacidad de las bacterias de producir ácido, reducir colorantes o producir halos de inhibición en un medio de cultivo, de manera que el resultado se puede interpretar visualmente.

También existen otros métodos basados en medidas de conductividad o de bioluminiscencia, ATP, aunque en la actualidad no son importantes.

Entre los métodos de cribado más utilizados en la detección de inhibidores en la leche cruda, se encuentran los métodos microbiológicos (Suhren, 1995; Reybroek, 1995; Korsrud *et al.*, 1998) basados en la inhibición del crecimiento de diferentes microorganismos como *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* (Carlsson y Björck, 1987), *Bacillus cereus*

(Suhren *et al.*, 1996) *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (Aureli *et al.*, 1995) y *Streptococcus thermophilus* (Mourot y Loussouron, 1981).

En los métodos microbiológicos durante el periodo de incubación, la leche difunde a través del medio (sólido o líquido) y si ésta contiene suficiente cantidad de sustancias antimicrobianas el crecimiento del microorganismo se verá reducido o inhibido. Dependiendo de cada desarrollo metodológico, la presencia de una sustancia antimicrobiana en la muestra se detectará por cambios de color, por observación en el medio de zonas de inhibición del crecimiento, o por bioluminiscencia.

En el Cuadro 11, se presenta una clasificación de los métodos microbiológicos que se utilizan para la detección de sustancias inhibitoras en la leche.

Existen muchos estudios que señalan que estos métodos están sujetos al efecto de sustancias inhibitoras presentes naturalmente en la leche como lactoferrina, lisozima, lactoperoxidasa (Carlsson y Björck, 1987; Beukers, 1991; Shiffmann *et al.*, 1992), ácidos grasos libres (Mäyrä-Mäkinen, 1990) y recuentos elevados de células somáticas o leucocitos (Carlsson y Björck, 1989; Tyler *et al.*, 1992; Van Eenennaam, 1993). La presencia de estas sustancias o componentes, pueden dar lugar a la presencia de resultados dudosos o a los conocidos como “falsos positivos”.

Otro factor a tener en cuenta en la aparición de resultados “falsos positivos” es la utilización de conservantes en la leche. Para preservar a las muestras del crecimiento microbiano durante el transporte y el almacenamiento se suelen emplear diversos conservantes como el azidol, el dicromato potásico, ácido bórico, bromopol, solución de formaldeído, entre otros.

En general la presencia de conservante a niveles normales no debe producir resultados “falsos positivos”, sin embargo, hay que prestar especial atención a la concentración que debe ser igual en todas las muestras, y tratar también el control negativo a la misma concentración para obtener resultados comparables (AiM, 2003).

Alguno de estos efectos pueden ser evitados o minimizados mediante el empleo de algunas técnicas como el calentamiento previo de la muestra, el uso de ensayos de disco y el empleo de membranas de diálisis que separan proteínas de alto peso molecular de los antibióticos de bajo peso molecular (Botsoglou y Fletouris, 2001).

Diversos autores (Nouws *et al.*, 1999a; Schlegelova y Rysanek 2000; Tsai y Kondo, 2001; Molina *et al.*, 2003b) recomiendan el calentamiento de las muestras de leche a 80-86°C durante 5-10 minutos antes de realizar el análisis de las muestras para inactivar los inhibidores naturales y reducir la incidencia de “falsos positivos”.

Cuadro 11. Métodos microbiológicos de cribado

Test	Muestra	Organismo	Incubación	Indicador	Confirmación
Accusphere test	Calentar a 95°C	<i>S. thermophilus</i> en esferas	4 h a 45°C en tubo	Púrpura de bromocresol (visual, cambio color)	Penicilinasas
Test de acidificación	Calentar a 100°C 5 min	<i>S. thermophilus</i> TJ	2,5 h a 45°C en tubo	Púrpura de bromocresol (visual, cambio color)	Penicilinasas o PABA y trimetopina
Arla test	Calentar a 80°C 2 min	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633 en tableta	6 h a 40°C en microplaca	Cloruro de trifenilterazolium (visual, cambio color)	Trimetopina
Test de bioluminiscencia	Calentar a 100°C 2 min	<i>S. thermophilus</i> TJ	20, 40 y/o 60 min a 45°C en tubo	Luciferín-luciferasa (uso de luminómetro)	Penicilinasas o PABA y trimetopina
Test de <i>B. subtilis</i>	Ensayo directo	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	14-24 h a 32°C ó 5-7 h a 37°C en placas con agar	No (visual, observación zona inhibición)	No
BR Test (BRT AiM, BR Test AS, Blue Star, 6, 7, AS-Special...)	Ensayo directo	<i>B. stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i> ATCC 10149	2,5 a 3,5 h a 60-70°C en microplacas	Negro brillante (visual, cambio color) o fotométrico	Penicilinasas o PABA y trimetopina
Test Eclipse	Ensayo directo	<i>B. stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i> ATCC 10149	2,5 a 3,5 h a 65°C en microplacas	Púrpura de bromocresol (visual o fotométrico)	Penicilinasas o PABA
Copan test (CH ATK)	Ensayo directo	<i>B. stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i> ATCC 10149 en agar	3 h a 65°C en microplacas	Púrpura de bromocresol (visual, o fotométrico)	Penicilinasas o PABA
Charm Farm test	Calentar a 100°C 6 min	<i>B. stearothermophilus</i> en tableta	3,8 h a 67°C en tubo	Púrpura de bromocresol (visual, cambio color)	Penicilinasas o PABA
Charm inhibition Assay	Ensayo directo	<i>B. stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i> ATCC 10149	2,3 a 64°C en placas de agar	Púrpura de bromocresol (visual, cambio color)	Penicilinasas o PABA
Ensayo de disco para penicilina	Ensayo directo	<i>B. stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i> ATCC 10149	3-4 h a 55°C o 2-3 h a 64°C en placas de agar	Púrpura de bromocresol (visual, cambio color)	Penicilinasas o PABA y trimetopina
Delvotest P/SP	Ensayo directo	<i>B. stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i> ATCC 10149	2,5 h a 64°C en ampollas o en microplacas de poliestireno	Púrpura de bromocresol (visual, cambio color) o fotométrico	Penicilinasas
Test de inhibición con <i>Sarcina lutea</i>	Ensayo directo	<i>Sarcina lutea</i> ATCC 9341	16-18 h a 30°C en pocillos excavados en el agar	No (visual, observación zona de inhibición)	Penicilinasas
Test Lumac	Ensayo directo	<i>S. thermophilus</i> OL 1010.59	35 min a 41°C en cubetas Lumac	3-(4,4-dimethylthiazolyl-2-) 2,5-diphenyl-tetrazolium bromide	No
Test de difusión en tubo	Ensayo directo	<i>B. stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i> ATCC 10149	2,5-2,75 a 64°C en tubo	Púrpura de bromocresol (visual, cambio color)	Penicilinasas o PABA y trimetopina
Valio T101 test	Calentar a 95°C 5 min	<i>S. thermophilus</i> T101	4,5 h a 42°C en viales o microplacas	Púrpura de bromocresol (visual, cambio color)	No

Por otra parte, hay que indicar que los laboratorios lactológicos utilizan los métodos de detección de inhibidores para analizar la calidad de la leche de vaca, para lo que han sido desarrollados y evaluados (Seymour *et al.*, 1998; Sischo y Burns, 1993; Charm y Zomer, 1995; Reybroeck, 1995; Andrew *et al.*, 1997).

Para considerar que un método es válido, debe documentarse que satisface unos criterios de evaluación tales como: especificidad o selectividad, rango, precisión, exactitud, límites de detección, etc., entre otros, que dependen del tipo de método empleado.

La selectividad, según Sischo y Burns (1993), indica la presencia de resultados “falsos positivos”. Mientras que la sensibilidad (FIL, 2002) señala si un método es adecuado para detectar un residuo al nivel que marca la legislación (LMR).

Entre los métodos más utilizados en España en los laboratorios lactológicos de control de calidad destacan aquellos que utilizan el *Bacillus stearothermophilus*, como son el método Delvotest[®], BRT[®] y Eclipse[®], entre otros.

El Delvotest[®] (DSM Food Specialties, Delf, Holanda) es también un método de difusión en tubo combinado con el púrpura de bromocresol como indicador de pH. Es sin duda, el método más empleado a nivel mundial, y del que más estudios se han realizado. Se define como un método sencillo, fiable, de suficiente sensibilidad, económico y de una amplia vida útil (Beukers, 1991), esto último debido a que los nutrientes se suministran separados del microorganismo.

La selectividad de la versión Delvotest[®] P ha sido estimada en un 96,9% (Andrew *et al.*, 1997), aunque algunos autores señalan la ausencia de “falsos positivos” en muestras individuales (Hillerton *et al.*, 1999).

En cuanto a la sensibilidad del Delvotest[®], los límites de detección más bajos se presentan para los antibióticos betalactámicos, con valores que se encuentran desde 2,5 µg/kg para la penicilina (Charm y Ruth, 1993) hasta 81 µg/kg para la cloxacilina (Senyk *et al.*, 1990).

La sensibilidad del método Delvotest[®] para detectar residuos de tetraciclinas es menor que la observada para los betalactámicos. Mientras que el fabricante (Gist Brocades, 1997) indica un límite de detección de 200-300 µg/kg para la tetraciclina y clortetraciclina, Van OS y Beukers (1980) obtienen un rango de 700 -1.500 µg/kg para la clortetraciclina.

Con respecto a las sulfonamidas, los valores límites a detectar no están muy claros, ya que Charm y Ruth (1993) indican concentraciones superiores a 1.000 µg/kg, pero no establecen un valor fijo para cada una de ellas mientras que Luitz *et al.* (1996) calculan una concentración de 25.000 µg/kg para la sulfadimetoxina.

En lo que se refiere al método BRT (Brillant Black Reduction Test), éste combina el principio de la difusión en agar con la reducción del negro brillante como indicador redox de color (Müller y Jones, 1993). Actualmente diferentes versiones del BRT está siendo fabricado por la empresa AiM Analytik in milch Produktions-und Vertriebs-GmbH (Munich, Alemania) y la empresa DSM Food Specialties (Delf, Holanda). Es el método recomendado en Alemania (Suhren, 2002) y en otros países por tratarse de una metodología económica, simple y rápida.

Diversos autores han comparado los límites de detección del BRT, observándose una marcada diferencia en los valores de los límites de detección para cada grupo de fármacos. Estas obedecen en gran parte a la diferencia de sensibilidad del *Bacillus stearothermophilus* para cada uno de ellos, y a las numerosas modificaciones que ha sufrido la versión original buscando una mejora en la sensibilidad.

Así por ejemplo, los límites de detección indicados para la penicilina y sus derivados, tales como la amoxicilina y ampicilina, están comprendidos entre 1-2 µg/kg (Frank, 1995) y 10 µg/kg (Charm y Ruth, 1993) respectivamente, mientras que las concentraciones de los restantes antibióticos betalactámicos deben hallarse entre 5-10 µg/kg en el caso de la oxacilina (AiM, 2003) y 300 µg/kg en la cefquinoma (Zorraquino, 1998) para poder ser detectadas por el método.

Para el caso de los aminoglucósidos, diversos autores señalan límites muy diferentes, por ejemplo, la firma fabricante (AiM, 2003) establece concentraciones de 300 a 400 µg/kg para la gentamicina y neomicina. Zorraquino (1998) calcula para estos aminoglucósidos concentraciones de 14.000 µg/kg y 15.000 µg/kg, respectivamente, y Heeschen (1993) encuentra 22.000 µg/kg para la neomicina y 28.000 µg/kg para la kanamicina.

Respecto a los macrólidos, al igual que con los aminoglucósidos, se observan diferencias entre los límites de detección calculados por diversos autores. Así, Analytic in Milch (AiM, 2003) señala concentraciones de 25-60 µg/kg para la eritromicina, mientras que Heeschen (1993) determina un límite muy superior (2.500 µg/kg) para dicho macrólido analizado mediante el BRT.

También se observan marcadas diferencias en los límites calculados por los diferentes autores en el caso de las tetraciclinas; Luitz y Suhren (1995) establecen límites de 400 µg/kg para la tetraciclina y oxitetetraciclina, mientras que Zorraquino (1998) determina valores de 1.900 y 1.500 µg/kg para cada las mencionadas tetraciclinas.

Los límites de detección señalados para las sulfonamidas son muy discrepantes, por ejemplo Heeschen (1993) y Heschen y Blüthgen (1995) señalan concentraciones comprendidas entre 100 y 1.000 µg/kg, mientras que Zorraquino (1998) obtiene límites cercanos a los 5.000 µg/kg para la sulfametacina y Frank (1995) indica un rango de 15.000 a 50.000 µg/kg para la misma sulfonamida.

Por último, el método Eclipse[®] es un método basado en el principio de difusión en tubo muy parecido al Delvotest[®] en cuanto a su fundamento: contiene esporas de *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* y púrpura de bromocresol. Este método, de fabricación nacional (Zeu-Inmunotec, Zaragoza), se presenta en varias versiones: Eclipse[®] 100, Eclipse[®] 50, Eclipse[®] Farm (en formato de tubos individuales) y Eclipse[®] Screening Plus. En esta última versión recientemente comercializada, se ha mejorado la sensibilidad frente a aminoglucósidos y macrólidos (ZEU-Inmunotec, 2003). Además, es el único método que dispone de una versión específica, Eclipse[®] 100ov, para la detección de antibióticos en la matriz leche de oveja (ZEU-Inmunotec, 2001).

Al ser el Eclipse[®] “100 ov” un método reciente, no existe apenas en la bibliografía datos referentes a su selectividad y sensibilidad. Únicamente a partir de la información suministrada por el fabricante se puede establecer que presenta unos límites de detección adecuados para la detección de antibióticos betalactámicos y también indican límites que se aproximan a los LMR en las tetraciclinas.

3.2.2. Métodos de postcribado o identificación preliminar

Hay que destacar que la técnica de cribado solo informa de la presencia o ausencia de un inhibidor, pero no da a conocer, en caso de resultados positivos, la identidad o la concentración del residuo, lo que hace necesario una posterior confirmación y cuantificación por técnicas más específicas.

En este apartado se agrupan aquellos métodos que permiten una detección más específica de los compuestos presentes en la leche, bien de grupos de sustancias (betalactámicos, tetraciclinas, etc.), bien sustancias individuales (cloranfenicol, gentamicina, ceftiofur, etc.). Además, en ocasiones, son métodos rápidos que aportan resultados en muy pocos minutos (10-15 minutos), a diferencia de los métodos microbiológicos que requieren entre 3 y 14 horas para suministrar un resultado.

Generalmente, se trata de métodos semicuantitativos, son similares a los cuantitativos pero los resultados se interpretan en relación a controles positivos y negativos que se analizan paralelamente a la muestra problema.

En la actualidad existen en el mercado una amplia variedad de este grupo de métodos, muchos de ellos validados por la FDA/AOAC y/o la FIL para su uso en leche cruda de vaca (FIL, 1991; AOAC, 2000; FDA, 2000). La mayor parte de ellos se desarrollaron inicialmente para la detección específica de betalactámicos, si bien, ahora hay disponibles un amplio número de variantes destinadas a la identificación específica de otras sustancias o grupos de sustancias.

En el Cuadro 12 se resumen algunos de los métodos específicos utilizados para la confirmación e identificación de residuos de medicamentos en la leche.

Cuadro 12. Métodos de confirmación e identificación de inhibidores

1. Métodos microbiológicos multiplaca de confirmación

2. Métodos enzimáticos

- Penzym®

3. Métodos Inmunoenzimáticos

- Transia GmbH
- Ridascreen® Antibiotics
- Lacteck
- Fluorophos Betascreen 4p test
- Parallax

4. Métodos de unión a receptores.

- Receptores microbianos (Charm I y Charm II)
- Receptores proteicos (SNAP, Delvo-X-Press βL, Tetrasensor, Beta Star, RASA Charm)

Fuente: FIL (1991), Zorraquino (2003)

A parte de la detección inespecífica (presencia/ausencia) de los métodos microbiológicos de cribado, algunos métodos microbiológicos incluyen la realización de una serie de placas dirigidas a la confirmación preliminar de la naturaleza de las sustancias antimicrobianas. Existen diversas versiones, como el sistema de “3 placas” o el de “6 placas”. Consisten fundamentalmente en la realización de una batería de varias placas que contienen diferentes microorganismos, medios de cultivo, pH y se incuban a distintas temperaturas. De este modo las placas poseen diferentes sensibilidades frente a los distintos grupos de sustancias antimicrobianas.

Entre los métodos microbiológicos de confirmación destacan la “técnica de las cuatro placas”, la STOP, y las Técnica STAR (Calderón, 2001). Estos bioensayos se tratan más detalladamente en el Apartado 4, ya que constituyen uno de los elementos básicos del presente trabajo.

También, entre los métodos de confirmación, cabe destacar los métodos enzimáticos. El más importante de ellos es el método Penzym® (Chr. Hansen, Hørsholm, Dinamarca) que es probablemente el método cualitativo para la detección de antibióticos betalactámicos en leche más utilizado de Europa dada su facilidad de empleo y su corto tiempo de análisis (15 minutos).

Otro de los grupos de métodos, son los basados en técnicas inmunoenzimáticas que emplean anticuerpos de altísima especificidad, lo que elimina totalmente el fenómeno de reacciones cruzadas de otros métodos. Muchos de ellos están basados en técnicas ELISA, radioinmunoensayo (RIA) y técnicas inmunoenzimáticas basadas en la fluorescencia.

En la actualidad se dispone de una amplia variedad de métodos basados en técnicas ELISA, que permiten el análisis de algunas sulfonamidas (sulfametazina, sulfadiazina, sulfaquinoxalina), tetraciclinas, cloranfenicol, aminoglucósidos (neomicina, gentamicina, estreptomycin), trimetoprim o tilosina, entre otros (Macho, 2003).

Por último, dentro del grupo de métodos de unión a receptores se pueden diferenciar a su vez aquellos métodos que se fundamentan en el uso de receptores microbianos y los que se basan en receptores proteicos.

Los métodos basados en receptores microbianos son métodos rápidos que permiten la detección de betalactámicos, macrólidos, aminoglucósidos, tetraciclinas, cloranfenicol y sulfonamidas (Mitchell *et al.*, 1998). Los principales representantes de este grupo son los métodos CHARM I (Charm y Chi, 1982) y, CHARM II (Charm y Chi, 1988; Suhren, 1993), que se utilizan fundamentalmente en Estados Unidos, donde están reconocidos por la "Food Drugs Administration" (FDA) para el análisis rápido de betalactámicos en leche.

El segundo grupo de métodos es el de unión a receptores proteicos, que esta basado en la unión del antibiótico problema a receptores proteicos conjugados a una enzima y que son específicos para un antibiótico determinado. En este grupo destacan el SNAP (IDEXX Laboratoires Inc., Westbrook, EEUU), el Delvo-X-Press β L (DSM Food Specialties, Delf, Holanda), el método Tetrasensor (Unisensor, Lieje, Bélgica) el Beta Star (UCB Bioproducts, Braine-L'Alleud, Bélgica/Chr. Hansen, Hørsholm, Dinamarca) y el ROSA Charm (Charm Science Inc., EEUU).

3.2.3. Métodos de cuantificación físico-químicos

Los métodos físico-químicos se utilizan para cuantificar e identificar de una forma inequívoca la presencia de residuos en las muestras de leche. Para ello se han desarrollado numerosas metodologías que se encuentran disponibles para diversos grupos de antimicrobianos.

Sin embargo, estos métodos son caros y muy laboriosos. Los métodos cuantitativos requieren haber controlado mediante instrumentación muy precisa un amplio rango de controles positivos a diversas concentraciones conocidas para poder extrapolar mediante curvas patrón la concentración de la muestra problema.

Estas técnicas se empezaron a utilizar de una forma muy limitada en análisis de residuos de antimicrobianos en alimentos, ya que se trata de matrices complejas lo que implicaba pobres porcentajes de recuperación (Mitchell *et al.*, 1998).

En leche se desarrollaron algunos métodos para la detección de betalactámicos a principios de los años 80 (Moats, 1983). En la actualidad, la edición nº 17 de los Métodos Oficiales de la AOAC (AOAC, 2000) describe varios métodos de análisis físico-químicos en leche, como el empleado en la detección de sulfametazina a niveles de entre 0,01-0,02 μ g/kg; el método

aplicable a la detección de 8 sulfonamidas a concentraciones de 0,005-0,02 µg/kg y el utilizado para la detección de tetraciclina, oxitetraciclina y clortetraciclina a concentraciones entre 0,015-0,080 µg/kg.

Las técnicas cromatográficas son las que se emplean con mayor frecuencia. Existen varios tipos de métodos, como la cromatografía de gases (GC), la cromatografía de capa fina (TLC), la cromatografía de capa fina/bioautografía (TLC/BA) o la cromatografía líquida (HPLC).

Debido a la naturaleza polar, no volátil y termosensible de los antibióticos el método más empleado es el HPLC (Mitchell *et al.*, 1998). En el Simposium sobre *Residues of antimicrobial drugs and other inhibitors in milk* celebrado en Kiel (Alemania) por la FIL (FIL, 1995), prácticamente todos las ponencias presentadas sobre métodos físico-químicos versaban sobre la técnica HPLC.

Así, esta técnica ha sido descrita para la cuantificación de tetraciclinas (Dudrikivá *et al.*, 1995; Sokol *et al.*, 1995), betalactámicos (Kramer *et al.*, 1995), trimetoprim (Sorensen y Frederiksen, 1995) o espiramicina y tilosina (Sorensen y Hansen, 1995), en la leche.

No obstante, se han aplicado otras técnicas como la espectroscopia de la transformada de Fourier de infrarrojo medio (FT-MIR) que permite la detección de tetraciclinas en leche de una forma rápida dentro de un rango de 4 a 2000 µg/kg (Sivakesava y Irudayaraj, 2002).

También se ha aplicado la electroforesis acoplada con bioautografía para la detección de betalactámicos en leche (Cutting *et al.*, 1995) y la electroforesis capilar que es otra técnica potencialmente aplicable para el análisis de antibióticos en leche (Van Schepdael y Hoogmartens, 2000).

En general, el análisis cromatográfico de una muestra de leche para detectar antibióticos requiere algunos pasos, que pueden alargar el proceso de determinación, como: centrifugación para desnatar, extracción a determinados pH, combinado con precipitación de proteínas, purificación mediante separación líquido-líquido y/o extracción en fase sólida de los extractos, separación cromatográfica y detección.

3.3. Problemática de la utilización de los métodos de detección en leche de pequeños rumiantes

Los métodos de detección de inhibidores pueden verse afectados por varios factores. Así, la diferente composición en inhibidores naturales y constituyentes principales de la leche, el diferente tamaño de los glóbulos de grasa, la distinta composición lipídica y el mayor número de leucocitos o células somáticas respecto a la leche de vaca son, seguramente, aspectos a tener en cuenta por su posible influencia en los métodos de detección utilizados en la leche de otras especies.

Los resultados experimentales de la aplicación de los métodos de detección de inhibidores en la leche de otras especies diferentes a la vaca son muy escasos.

En el caso de la leche de cabra, Contreras *et al.* (1997), al estudiar la utilización del método Penzym[®] indican que solamente una muestra de un total de 935 presentó un único resultado “falso positivo”, lo que se debió a un elevado recuento de células somáticas característico del final de la lactación, por lo que estos autores recomiendan el uso del Penzym[®] para esta especie.

El efecto del tratamiento térmico de las muestras de leche de vaca, cabra y oveja sobre la respuesta de los métodos Delvotest[®], Intertest[®] y T.T.C.-test[®] fue estudiado por Anifantakis *et al.* (1988). En su trabajo señalan que el calentamiento a 95 °C durante 5 minutos no produce cambios en la respuesta del método Delvotest[®] y T.T.C.-test[®], mientras que la frecuencia de casos positivos del método Intertest[®] disminuye al realizar un calentamiento previo de las muestras de leche de las tres especies estudiadas.

La validación de los métodos LacTek[®] y Charm[®] II para ser utilizados con muestras de leche de cabra fue realizada por Zeng *et al.* (1996), quienes observan una sensibilidad del 100 % para la detección de amoxicilina, ampicilina, ceftiofur[®] cefapirina y Penicilina G con el método Charm[®] II, mientras que al emplear el método LacTek[®] la sensibilidad fue mas baja, detectando 90, 96,7, 36,7, 83,3, 80 y 100% de amoxicilina, ampicilina, cefapirina, cloxacilina, penicilina G y ceftiofur[®], respectivamente.

Barbosa (1997) expone que, en el caso de la leche de cabra, existen estudios que señalan que un nivel elevado de ácido butírico en determinadas muestras de leche son la causa de resultados positivos al emplear métodos que utilizan el *Bacillus stearothermophilus*, mientras que estas mismas muestras fueron negativas con métodos que usan el *Bacillus subtilis*.

La diferente composición de la leche de oveja (Gonzalez-Llano *et al.*, 1989; Molina y Gallego, 1994) en comparación con la leche de vaca (Anifantakis, 1986), podría ser otro motivo de la presencia de resultados “falsos positivos”.

En el caso de la leche de oveja, en diferentes estudios experimentales (Althaus, 1999, Althaus *et al.*, 2001, 2002, 2003a,b; Molina *et al.*, 2001, 2003a,b) han ensayado diferentes métodos de cribado microbiológicos y enzimáticos (BRT AiM[®], Delvotest[®] y Penzym[®]) con diferentes condiciones de preparación de la muestra de leche.

En dichos estudios se ha analizado la selectividad (presencia de “falsos positivos”) y la sensibilidad (límites de detección) de los métodos citados anteriormente para el caso concreto de la leche de oveja.

Así Molina *et al.* (2003a), cuando estudian la leche de oveja empleando el test BRT AiM[®] y el Delvotest[®] obtienen selectividades de 96,3% y 97,7%

respectivamente. Sin embargo cuando someten las muestras a un tratamiento térmico (85 °C; 10 minutos) estos valores resultan superiores, 99,0% y 98,7%, lo que indican que la temperatura impide la acción de los inhibidores naturales, así como de otros componentes característicos de la leche de oveja que pueden interferir en los métodos.

Es importante destacar que estos autores (Molina *et al.*, 2003a) cuando estudian la influencia del conservante azidiol, añadido a las muestras de leche, obtuvieron unos valores de selectividad inferiores, tanto para las muestras tratadas térmicamente (BRT AiM[®]: 94,8% y Delvotest[®]: 95,3%), como para las que no recibieron tratamiento (BRT AiM[®]: 90,2% y Delvotest[®]: 91,0%).

Esto último pone de manifiesto, la influencia negativa de determinados conservantes, en la sensibilidad de los métodos microbiológicos, puesto que actúa reduciendo el desarrollo normal del microorganismo que forma parte de cada test, siendo en este último caso el *Bacillus stearothermophilus*.

A su vez, Althaus *et al.* (2003a) analizan las causas de la presencia de “falsos positivos” en los métodos microbiológicos BRT AiM[®] y Delvotest[®] asociadas a la composición de la leche y los inhibidores naturales. Estos autores concluyen que porcentajes de materia seca bajos, junto a contenidos en células somáticas elevados suelen presentarse con más frecuencia en los resultados “dudosos” y “falsos positivos”.

Los límites de detección estudiados para el método BRT AiM[®] con predifusión por Molina *et al.* (2003b) en leche de oveja muestran una adecuada sensibilidad del test para la detección de betalactámicos a los niveles marcados por la UE, mientras que los límites de detección para otros grupos de antimicrobianos (aminoglucósidos, macrólidos, tetraciclinas, sulfonamidas, cloranfenicol y trimetoprim), se alejan de los LMRs regulados.

Respecto a la sensibilidad del Delvotest[®] “SP” en leche de oveja (Althaus *et al.*, 2002, 2003b), indican que los límites de detección son muy buenos, cuando el objeto de detección son los antibióticos betalactámicos, las sulfonamidas, y la tilosina. En contraste los límites de detección se alejan de los LMRs establecidos por la UE para los grupos de aminoglucósidos, tetraciclinas, trimetoprim y cloranfenicol.

En cuanto al método enzimático Penzym[®], Molina *et al.* (2001) señalan que al emplear leche de oveja, es necesario alargar el tiempo de análisis a 22 minutos para alcanzar una selectividad del 97% y evitar la aparición de un gran número de “falsos positivos”. Los límites de detección de este método (Althaus *et al.*, 2001) señalan una alta sensibilidad para la detección de penicilina, ampicilina y oxacilina, mientras que para otros antibióticos (cloxacilina y ceftiofur[®]) la sensibilidad es más baja.

Es por todas estas razones por lo que, en el Symposium sobre "Nondestructive testing, pasteurization requirements and antibiotics in Dairy products" organizado por la FIL y celebrado en Lisboa en abril de 1997, y en el seminario de la FIL en Toledo en 2002, el grupo de expertos en residuos y

contaminantes de la leche (Grupo E47 “*Antimicrobials and other veterinary residues*”) recomendó la necesidad de realizar más estudios con la finalidad de evaluar la utilización de los métodos comerciales empleados para la detección de residuos en el caso de leche procedentes de otras especies, como la oveja y cabra.

En el caso específico de los sistemas multiresiduos, como se ha comentado anteriormente, esta técnica fue desarrollada solamente para el caso concreto de leche de vaca no existiendo ningún trabajo experimental sobre su validación en la leche de otras especies. Dicho aspecto se considera necesario para poder aplicar este método en la detección de residuos y así disponer de una herramienta eficaz en el control de la calidad de la leche y en el cumplimiento de la normativa comunitaria.

4. MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS MÚLTIPLES O BIOENSAYOS

4.1. ASPECTOS GENERALES

Los métodos microbiológicos, fueron el primer sistema de detección de residuos de antimicrobianos desarrollado en alimentos. Estos métodos se basan fundamentalmente en la inhibición del crecimiento de un microorganismo sensible a los residuos de medicamentos quimioterapéuticos, que puedan estar presentes en la leche, carne u otros productos de origen animal.

En este principio se fundan las técnicas de cribado o “screening”, que siendo métodos cualitativos, establecen la presencia o ausencia de residuos. Generalmente se trata de métodos inespecíficos, lo que los hace adecuados para la detección de un amplio rango de sustancias simultáneamente.

Además, como se ha comentado anteriormente, los métodos de inhibición microbiana de cribado, son muy sensibles a los antibióticos betalactámicos, principalmente a la penicilina, pero no los son tanto frente a otros grupos de sustancias como macrólidos, sulfonamidas, tetraciclinas o cloranfenicol y los límites de detección que presentan suelen ser superiores a los LMRs.

Por lo tanto, la información sobre la identidad del residuo que se obtiene a través de la técnica de cribado, es insuficiente para conocer a que método específico recurrir para llegar a la confirmación y cuantificación y, así resulta conveniente identificarlo y, en su caso, cuantificarlo para verificar si su nivel supera el límite máximo de residuos establecido por la legislación vigente.

Este hecho hace necesario el empleo de una técnica de post-cribado que enlace el estudio presuntivo con la confirmación definitiva. No existen muchas técnicas de identificación o confirmación preliminar debido a que, hasta la aparición de los Límites Máximos de Residuos, en muchos países la evaluación de las muestras se basaba únicamente en el resultado de la técnica de cribado (Calderón, 2001).

Como técnicas de post-cribado actualmente, pueden utilizarse técnicas microbiológicas (Myllyniemi *et al.*, 1999), inmunológicas (Dixon-Holland, 1992), radiológicas (Korsrud *et al.*, 1992), de luminiscencia (Kurittu *et al.*, 1999) electroforesis (Cutting *et al.*, 1995) o cromatografía en capa fina con bioautografía (Salisbury *et al.*, 1989).

Las técnicas microbiológicas de post-cribado cuentan con varias ventajas por su sencillez, bajo coste y capacidad de detección.

Dentro de las técnicas de identificación preliminar microbiológicas, se encuentran los métodos denominados de "Bioensayo Multiresiduo", también llamados "Sistemas Microbiológicos Múltiples o Multiplaca" cuya función primordial, es identificar simultáneamente los diferentes grupos de antimicrobianos, empleados en medicina veterinaria, cuyos residuos, que habían sido detectados en el cribado, pueden aparecer en los alimentos.

Los bioensayos multiresiduo, son técnicas basadas en la difusión de la muestra objeto de estudio, en un agar con diferentes condiciones de pH y donde se han inoculado distintos microorganismos que son sensibles a un residuo concreto. La sensibilidad, se manifiesta con la aparición de un halo de inhibición alrededor de la muestra, que se puede llegar a cuantificar.

Grove y Randall (1955), empezaron a desarrollar las técnicas microbiológicas multiplaca que fueron mejoradas en 1959 por Deutchberger y Krishbaum (Kavanagh, 1975) que establecieron un diseño con diferentes tipos de placas que permitía cuantificar antibióticos en diferentes matrices. Posteriormente en Estados Unidos, Fugate (1974) empleó técnicas similares para detectar diferentes antimicrobianos de modo simultáneo.

Por su parte, Kavanagh (1989) cuando estudiaba diferentes métodos de detección de antibióticos, destacó la importancia de métodos microbiológicos de difusión en agar, valorando principalmente el poder cuantificar mediante curvas de calibración que relacionan la concentración de antibiótico con el desarrollo microbiano.

A su vez, Calderón (1995) comenta que cuando emplea técnicas de este tipo, para cuantificar un residuo puesto en evidencia, mediante una técnica microbiológica, debe conocerse previamente la identidad del antibiótico. Para ello es necesario establecer una recta de calibración mediante la utilización de disoluciones patrón de concentraciones conocidas del antimicrobiano objeto de estudio, que permitan interpolar el diámetro del halo obtenido con una muestra y calcular la concentración correspondiente.

Existen otras publicaciones que ponen de manifiesto el empleo de estas técnicas (FSIS, 1991) y el desarrollo de nuevos métodos microbiológicos múltiples empleados en determinación de antimicrobianos en productos de origen animal (Nouws *et al.*, 1999a, b).

4.2. TIPOS DE BIOENSAYOS

Existen diversos bioensayos que se pueden utilizar para la semi-cuantificación de antimicrobianos por difusión en agar. Algunos de los más destacados en la bibliografía se describen seguidamente.

Uno de los más conocidos es el descrito por la "Association Official Analytical Chemists" (AOAC, 1984), que se basa en la utilización de un elevado número de placas y un sistema de corrección de resultados, para evitar la variabilidad que se produce entre placas. Esta técnica es demasiado compleja, y actualmente no sería aplicable para el análisis rutinario de residuos de antibióticos en alimentos.

Otra posibilidad es aplicar un sistema simplificado de "**3 placas**" como el descrito por Brady y Katz (1987). Estos autores, emplearon como microorganismos *Bacillus cereus* ATCC 11778, sensible al grupo de tetraciclinas, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, para los aminoglucósidos y *Micrococcus flavus* que identifica la bacitracina. Este diseño es comparable en exactitud y precisión al de la AOAC (1984) y resulta más adecuado para el análisis de residuos en leche y carne por su simplicidad.

También, existe otro sistema de "**3 placas**" que aparece reflejado en el boletín de la FIL nº 258 (FIL, 1991) que se basa en ensayos de discos. En una placa se inocula *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* (betalactámicos, e incluso tetraciclinas), en otra *Bacillus subtilis* (aminoglucósidos y macrólidos), y en la tercera *Bacillus megaterium* (cloranfenicol y sulfonamidas).

Por otra parte, la Federación Internacional de Lechería, describe un sistema "**6 placas**" (FIL, 1991), en el que la muestra se coloca en perforaciones cilíndricas realizadas en el agar o sobre discos, en 6 placas que contienen *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* a pH 6, *Bacillus subtilis* a pH 8, *Sarcina lutea*, *Escherichia coli*, y *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*. Cada placa se incuba a la temperatura y al tiempo óptimo. Si en alguna de las placas, se observa una zona de inhibición de más de 1 mm alrededor de los discos o perforaciones, el resultado se considera positivo.

Un método de características similares es el empleado en el Laboratorio Nacional de Referencia Francés dependiente de la Agencia Francesa de Seguridad Sanitaria de los Alimentos (AFSSA, 1990). Es la técnica oficial para la detección de antibióticos y sulfonamidas en leche destinada a la alimentación humana o animal.

En este método, tras una primera etapa de cribado (acidificación) con el microorganismo *Streptococcus thermophilus*, en la que se pone en evidencia la presencia del antimicrobiano, se pasa a continuación al método de confirmación propiamente dicho, en el que se emplean 3 placas de Petri de 100 mm de diámetro. Estas placas se siembran con *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C953 (penicilinas y tetraciclinas), *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (aminoglucósidos y macrólidos), y *Bacillus magaterium* ATCC 9885

(sulfonamidas y cloranfenicol), inoculados en diferentes medios de cultivo y condiciones de pH determinadas.

Una particularidad de esta técnica empleada en Francia (AFSSA, 1990) es que emplea discos de papel de filtro de 9 mm de diámetro en los que se impregna la muestra de leche colocándose, de este modo, directamente sobre las placas. El resultado se interpreta como positivo cuando tras el período de incubación determinado, a las temperaturas adecuadas, se observan halos de inhibición alrededor de los discos de al menos 1 mm (es decir aumento en el radio de 0,5 mm).

También en el Laboratorio Nacional de Referencia Francés, anteriormente citado, y empleado como método oficial para detectar antibióticos en músculo de animales, se utiliza una técnica basada en un bioensayo multiplaca. En este caso, emplea placas de 90 mm, con diferentes medios de cultivo en las que se colocan como microorganismos tests *Bacillus subtilis* BGA inoculado a pH 6,0, 7,2 y 8,0 y *Micrococcus luteus* a pH 8,0.

Con la muestra cárnica, se hacen cilindros de 8 mm de diámetro y 2 cm de longitud que se cortan en pequeñas piezas de 2 mm de espesor que se colocan en las placas hasta un máximo de 6 muestras por placa. El resultado se considera positivo cuando se obtiene radios mayores o iguales a 2 mm (12 mm de diámetro total). *Bacillus subtilis* a pH 6,0 permite detectar particularmente antibióticos de la familia de betalactámicos y en su caso tetraciclinas, este microorganismo a pH 7,2 detecta residuos de sulfonamidas, y a pH 8,0 detecta aminoglucósidos, mientras que mediante *Micrococcus luteus* se detectan residuos de macrólidos y en ocasiones betalactámicos.

La exigencia de mayor sensibilidad que supone el establecimiento de los LMRs y la diversidad de técnicas de cribado o el seguimiento de distintos protocolos en la UE, llevaron al Laboratorio Comunitario de Referencia para residuos de antibióticos a proponer una posible nueva técnica de cribado europea (AFSSA, 1999) denominada STAR ("Screening test for antibiotic residues"). Esta actualmente en desarrollo y se emplea tanto en tejido animal como en leche. Es similar a la anteriormente mencionada pero en este caso emplea 5 placas (*Bacillus subtilis* pH 7,2; *Kocuria varians* pH 8; *Bacillus cereus* pH 6; *Escherichia coli* pH 8 y *Bacillus stearothermophilus* pH 7,4) y modifica las condiciones de trabajo.

Por otra parte, el método descrito por Calderón (2001) y desarrollado como técnica de identificación preliminar de bioensayo múltiple, en el Instituto de Salud Carlos III (Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid), se emplea para detectar residuos de antimicrobianos en muestras de tejidos animales.

Dicha técnica microbiológica de difusión en placa Petri (90 mm de diámetro) que utiliza 13 placas con diferentes medios de cultivo, y en las que se inoculan 5 microorganismos *B. cereus* pH 4,5, *M. luteus* pH 6 y pH 8, *B. subtilis* pH 8, *S. epidermidis* pH 8 y *E. coli* pH 8, que son sensibles a diferentes grupos de antimicrobianos (Calderón, 2001).

Es importante destacar que en esta técnica, con el objeto de hacer más específica la detección de penicilinas y cefalosporinas, se emplean las enzimas betalactamasa y cefalosporinasa. Para diferenciar aminoglucósidos y quinolonas, se emplea el mucopolisacárido heparina, a cuya acción son sensibles los aminoglucósidos. Las características de esta metodología se presentan en el Cuadro 13.

El amplio número de placas empleado con esta técnica, permite identificar con mayor precisión los diferentes grupos de antimicrobianos y dentro de éstos antibióticos concretos.

Cuadro 13. Método de bioensayo modificado

PLACA	MICROORGANISMO	BL	CF	H
A	<i>B. cereus</i> CECT 193	si	no	no
α	<i>B. cereus</i> CECT 5314	si	no	no
B	<i>M. luteus</i> CECT 4070	no	no	no
C	<i>M. luteus</i> CECT 4070	si	no	no
Z	<i>M. luteus</i> CECT 4070	no	si	no
D	<i>B. subtilis</i> CECT 356	si	no	no
δ	<i>B. subtilis</i> CECT 356	si	no	si
E	<i>M. luteus</i> CECT 4070	si	no	no
F	<i>M. luteus</i> CECT 4093	si	no	no
G	<i>S. epidermidis</i> CECT 231	si	no	no
γ	<i>S. epidermidis</i> CECT 231	si	no	si
Q	<i>E. coli</i> CECT 4201	si	no	no
K	<i>E. coli</i> CECT 4201	si	no	si

BL: betalactamasa; CF: cefalosporinasa; H: heparina

Fuente: Calderón (2001)

Este último método se ha adaptado también en el Laboratorio Interprofesional Lechero de Cataluña (LILC) y en el se ha trabajado con una matriz distinta a la cárnica, en concreto se ha trabajado con leche de vaca (Montero, 2001). Se emplea el microorganismo *B. cereus* pH 6,5, *B. stearothermophilus* pH 6,8, *B. subtilis*, *M. luteus* y *S. epidermidis* pH 7,9. También emplea las enzimas cefalosporinasa y penicilinasa, para interpretar con mayor seguridad los resultados correspondientes a betalactámicos.

La técnica empleada en el LILC, para la detección de residuos en leche de vaca, se refleja en el Cuadro 14.

Cuadro 14. Características de un bioensayo aplicado a leche de vaca

Placa	Microorganismo	PE	CF	Antimicrobiano
1	<i>E. coli</i> ATCC 11303	no	no	Quinolonas
A	<i>B. cereus</i> ATCC 1177	si	no	Tetraciclinas
B	<i>B. stearothermophilus</i>	no	no	Betalactámicos
C	<i>B. stearothermophilus</i>	si	no	Penicilinas
Cbis	<i>B. stearothermophilus</i>	no	si	Cefalosporinas
D	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	si	no	Aminoglucósidos
E	<i>M. luteus</i> ATCC 9341	si	no	Macrólidos
F	<i>M. luteus</i> ATCC 9341	si	no	eritromicina
G	<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	si	no	Aminoglucósidos (no estreptomicina)

PE: penasa; CF: cefalosporinasa

Fuente: Montero (2001)

A su vez, el laboratorio Nacional de Referencia (Centro Nacional de Alimentación-Agencia Española de Seguridad Alimentaria-CNA-AESA, Madrid), propone la técnica de **“las cinco placas”**, basada en la modificación del sistema “EC Four Plate” (sistema de 4 placas) recomendado por Bogaerts y Wolf (1980). La técnica, fue propuesta por el Comité Científico Veterinario de las comunidades europeas como técnica de cribado de residuos de antibióticos en carne.

Así, Calderón *et al.* (2003) describen este sistema que está formado por cinco placas: *Bacillus subtilis* a pH 6 en la que se detectan preferentemente tetraciclinas, a pH 7,2 para las sulfonamidas a niveles altos y a pH 8, antibióticos aminoglucósidos. La placa con *Micrococcus luteus* mejora la detección de algunos antibióticos betalactámicos y macrólidos, y la placa de *Escherichia coli*, permite detectar residuos de quinolonas

En, este método, la lectura de los halos de inhibición se realizará con un calibrador digital y una lámpara de iluminación. El resultados del ensayo será “positivo” si se producen zonas de inhibición de, al menos 2 mm de anchura (desde el borde de la muestra al borde de la zona de inhibición).

Generalmente, cada placa es específica para un determinado grupo de antimicrobianos, pero en ocasiones, la inhibición del crecimiento bacteriano se produce por otro grupo que interfiere en el resultado final de dicha placa. Si el nivel de antibiótico es alto la inhibición puede darse en varias o todas las placas. Únicamente las sulfonamidas causan inhibición de forma casi exclusiva en la placa con *B. subtilis* a pH 7,2 gracias a la presencia de trimetoprim, un agente sinérgico.

En los últimos años, ha sido desarrollado por el “Instituto para la calidad de los productos alimentarios” del Ministerio de Agricultura holandés (Rijks-Kwaliteitsinstituut voor lan-en tuinbouw-produkten, RIKILT-DLO) otro sistema de bioensayo multiresiduo (Nouws *et al.*, 1998, 1999a,b)., específico para la leche de vaca. Este método, de difusión en placa, emplea “**6 ó 7 placas**” en las que se encuentran diferentes medios de cultivo inoculados con distintos microorganismos de prueba (bacteria-test) que actúan como sensores biológicos específicos para los diferentes grupos de antimicrobianos.

Este bioensayo es una técnica muy completa que permite detectar de modo múltiple casi la totalidad de residuos de antimicrobianos presentes en la leche cruda, leche en polvo, y leche para consumo humano de vaca, y por ello recibe también el nombre de “Sistema Microbiológico Multiresiduo o Multiplaca” (SMMP).

4.3. SISTEMA MICROBIOLÓGICO MULTIPLACA (SMMP)

El “Sistema Microbiológico Multiresiduo o Multiplaca” (SMMP) que ha sido descrito por Nouws *et al.* (1998, 1999a,b), consiste en la preparación de 7 placas de Petri (140 mm de diámetro) con 6 microorganismos cuyas características aparecen reflejadas en el Cuadro 15. En este cuadro se muestra con detalle los microorganismos empleados (formas esporuladas y vegetativas), su concentración, la composición y pH de los medios de cultivo, la temperatura y tiempo de incubación, así como los residuos objeto de detección en las distintas placas.

La elección de cada microorganismo, ha sido realizada en función del residuo objeto a detectar, buscándose la cepa más sensible para cada grupo de antimicrobianos. La composición de los medios de cultivo (agar) y condiciones de cultivo han sido optimizadas para conseguir la máxima difusión del residuo y mejor desarrollo microbiano. Además el método ha sido estandarizado para conseguir una buena repetibilidad y reproducibilidad de los resultados.

En el Cuadro 16 se resumen las concentraciones mínimas inhibitorias obtenidas por Nouws *et al.* (1999a), para diferentes sustancias antimicrobianas analizadas mediante el sistema multiplaca junto a los Límites Máximos de Residuos establecidos por la UE.

En todos los grupos ensayados, betalactámicos, tetraciclinas, sulfonamidas, macrólidos, aminoglucósidos, quinolonas y otros, tal y como se observa en el Cuadro 16, la gran mayoría de Concentraciones Mínimas Inhibitorias obtenidas son menores que los Límites Máximos de Residuos establecidos por la UE.

Además, Nouws *et al.* (1999a), estudiaron 48 sustancias antimicrobianas pertenecientes a diferentes grupos, y en la gran mayoría de ellas se han conseguido niveles de detección muy cercanos al LMR. Todo ello indica la gran sensibilidad de SMMP, para la detección de gran parte de grupos de residuos

Cuadro 15. Características del Sistema Microbiológico Multiplaca (SMMP)

Microorganismo	Medio de cultivo	pH	Tª(°C)	Tiempo(h)	Objetivo de detección
<i>B. sterarothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i> C953; 10 ⁵ esporas /mL de agar	PCA Plate count agar (Difco)	8,0	55	6	Betalactámicos, tilosina ,rifamicina
<i>B. cereus</i> var. <i>mycoides</i> ATCC11778 10 ⁵ esporas /mL de agar	STD II Standar II Nähragar + suplementos (KH ₂ PO ₄)	6,0	30	16-18	Tetraciclinas (tetraciclina, clortetraciclina, oxitetraciclina, doxiciclina)
<i>M. luteus</i> ATCC 9341 10 ⁶ ufc /mL de agar	MH-M Mueller Hinton agar (Merk)	8,0	30	16-18	Macrólidos (espiramicina, eritromicina, tilosina), rifamicina
<i>B. subtilis</i> BGA (Merk art.10649) 10 ⁴ esporas /mL de agar	PCA Plate count agar (Difco)	8,0	30	16-18	Aminoglucósidos (estreptomina, meomicina, kanamicina, gentamicina)
<i>B. subtilis</i> BGA (placa sulfas) 10 ⁴ esporas /mL de agar	MH-O Mueller Hinton agar (Oxoid) + suplementos (sangre, TMP)	7,0	37	16-18	Sulfamidas, dapsona, trimetoprim, bacquiloprim
<i>E. coli</i> ATCC 11303 10 ⁶ ufc /mL de agar	PCA Plate count agar (Difco) + suplementos (extracto de carne)	6,0	30	16-18	Quinolonas(enrofloxacina,marbofloxa cina, flumequine), polimixinas (colistina)
<i>St.epidermidis</i> ATCC 12228 10 ⁶ ufc /mL de agar	PCA Plate count agar (Difco)	6,0	30	16-18	Novobiocina, rifamicina

Fuente: Nouws *et al.* (1999a)

de antimicrobianos en el caso de la leche de vaca cruda, deshidratada y preparada para consumo humano.

Los citados autores también realizan un estudio, para comprobar el grado de especificidad de cada una de las placas empleadas, para detectar el grupo de antibióticos al que es sensible. En este ensayo obtienen que la placa de *B. cereus* presenta una gran especificidad para detectar tetraciclinas, así como la de *E. coli* para quinolonas, y *M. luteus* en el caso de macrólidos. Sin embargo en la placa de *B. stearothermophilus*, en ocasiones según la concentración presente de otros antimicrobianos, pueden interferir algunos aminoglucósidos. Del mismo modo señalan que la placa que emplea *B. subtilis* y que es sensible a la presencia de sulfonamidas, es la que puede proporcionar mayor incertidumbre en el resultado obtenido.

Por todo ello, Nouws *et al.* (1999a,b), indican que en el caso de encontrar interferencias, es aconsejable emplear métodos posteriores de confirmación, empleando en primer lugar sustancias como penicilinas y PABA, y si fuese necesario, éstas combinadas con técnicas cromatográficas.

Cuadro 16. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del SMMP en leche de vaca y Límites Máximos de Residuos (LMRs)

Antimicrobiano	CMI	LMR-UE	Antimicrobiano	CMI	LMR-UE
<u>Betalactámicos</u>			<u>Macrólidos</u>		
Penicilina	2	4	Eritromicina	10	40
Ampicilina	2	4	Espiramicina	75	200
Amoxicilina	3	4	Tilmicosina	6	50
Cloxacilina	15	30	Tilosina	100	50
Dicloxacilina	15	30	<u>Aminoglucósidos</u>		
Oxacilina	20	30	Gentamicina	25	100
Cefacetriilo	15	125	Neomicina	50	500
Cefalexina	45	100	Kanamicina	150	-
Cefalonium	10	20	DH/Estreptomina	100	200
Cefoperazona	30	50	<u>Quinolonas</u>		
Ceftiofur	30	100	Enrofloxacina	4	100
Cefquinoma	80	20	Flumequina	150	-
Cefapirina	5	10	Marbofloxacina	5	75
Cefazolin	10	50	Danofloxacina	-	30
<u>Tetraciclinas</u>			<u>Varios</u>		
Clortetraciclina	10	100	Novobiocina	25	50
Oxitetraciclina	30	100	Baquiloprim	20	30
Tetraciclina	30	100	Dapsona	1	0
<u>Sulfonamidas</u>			Trimetroprim	50	50
Sulfametacina	40	100	Rifamicina	60	-
Sulfadiazina	30	100	Colistina	100	50
Sulfadimetoxina	20	100			

Unidades: µg/kg

Fuente: Nouws *et al.* (1999a, b)

4. 4. CRITERIOS DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

Actualmente, se demandan métodos que posean límites de detección y de cuantificación adecuados para los límites legislados (LMR) de cada antimicrobiano. Por este motivo es necesario someter a evaluación a cada método para comprobar el nivel de cumplimiento de estos requisitos.

Así, se define la validación de un método como el proceso de confirmación de que un procedimiento analítico empleado para un análisis específico es adecuado para ese uso previsto.

No existe una normativa armonizada de carácter internacional para la validación de métodos. Aunque sí existen directrices genéricas del *Codex Alimentarius*, de la Food Drugs Administration (FDA), Association of Official Analytical chemists (AOAC), así como normas de la Federación Internacional de lechería (FIL).

Según el *Codex Alimentarius* (Codex Alimentarius, 1996) un método validado es aquel cuya exactitud, precisión, reproducibilidad y resistencia han sido objeto de un estudio realizado por varios laboratorios. Los parámetros típicos de un proceso de validación son la especificidad, selectividad, precisión, exactitud, porcentaje de recuperación, curva de calibración, linealidad, rango de trabajo, límite de detección, límite de cuantificación y robustez.

La Unión Europea en la Decisión 2002/657/CE, ha establecido los procedimientos de validación para los métodos analíticos de cribado y de confirmación. Admite la validación a través de estudios interlaboratorios, como establece el *Codex Alimentarius*, las normas ISO o la IUAP, y también admite estudios en un solo laboratorio o validación interna.

Cuadro 17. Clasificación de los métodos analíticos en función de las características de funcionamiento (Decisión 2002/657/CE)

Métodos		Límite detección	Límite decisión	Veracidad/ recuperación	Precisión	Selectivida/ Especificidad	Aplicabilida/ Robustez/ Estabilidad
Cualit.	Cribado	+	-	-	-	+	+
	Confirm.	+	+	-	-	+	+
Cuantit.	Cribado	+	-	-	+	+	+
	Confirm.	+	+	+	+	+	+

+ = determinación obligatoria

Cualit.: cualitativos; Cuantit.: cuantitativos; Confirm.: confirmación

Las técnicas microbiológicas de determinación de residuos de antibióticos en alimentos presentan características específicas, ya que aunque utilicen microorganismos, su objetivo no es el estudio de los microorganismos sino que estos son utilizados como agente detector de una actividad antibacteriana.

Por otra parte, el Grupo E47 de la FIL “*Antimicrobials and other veterinary medical residues*” ha elaborado una guía para la estandarización de los métodos basados en la inhibición microbiana (Guidelines for a standardized description of microbial inhibitor test: ISO/FDIS 13969/FIL, 2002). Con esta guía se pretende estandarizar y proporcionar una base para la evaluación/validación de los métodos de inhibición microbiana, permitiendo la comparación de los datos obtenidos con diferentes métodos y estudios experimentales.

En la citada guía y como prerrequisitos al estudio de validación de métodos para la leche de vaca, se establece que debe proceder de animales sanos (<150.000 células somáticas/mL y 10.000 ufc/mL), que no hayan recibido ningún tratamiento ni alimentación con antibióticos en las ocho semanas anteriores al ensayo, las muestras deben recogerse en mitad de la lactación (60-20 días post-destete), y la leche ha de proceder del ordeño de al menos 5-7 animales que se mezclará para eliminar variaciones individuales.

No obstante, si un análisis se aplica a la leche de una especie animal diferente de la vaca, debería realizarse el correspondiente ajuste en los requisitos relativos a dicha especie.

También establece esta guía la calidad exigida a las sustancias controlas, el modo en el que se deben realizar las disoluciones, las concentraciones que se deben ensayar, cómo se deben conservar, etc.

Para considerar que un método es válido debe documentarse que satisface unos criterios de evaluación, en la citada guía de la FIL (FIL, 2002) se define los parámetros o especificaciones que debe aportar un método, como la selectividad, especificidad, “falsos positivos” y “falsos negativos”, límite de detección, repetibilidad y reproducibilidad.

La selectividad, según Sischo y Burns (1993), se define como la relación entre el número de casos negativos y el total de muestras analizadas por un determinado método cuando se utilizan muestras de leche procedentes de animales no tratados. Mientras que la sensibilidad está relacionada con los límites de detección del método (FIL, 1997, 2002) e indica si es adecuado para detectar un residuo al nivel que marca la legislación (LMR).

En lo que se refiere a la determinación de los límites de detección, existen diferentes criterios de cálculo, según se consideren calificaciones visuales (Suhren y Heeschen, 1993; Suhren y Walte, 2003) o absorbancias medidas por un fotómetro a diferentes longitudes de onda (Luitz y Suhren, 1995; Luitz *et al.*, 1996).

Respecto al parámetro de especificidad, hay que señalar que es la medida en la que la presencia de sustancias con una estructura química o partes de la estructura similares a la del analito original presente en una muestra, dará también lugar a unión y producirá, por consiguiente, un resultado positivo en el sistema de análisis conocida como “reacción cruzada” (ISO, 2003).

La repetibilidad es la variabilidad entre análisis repetidos dentro de un laboratorio por un solo analista (Zorraquino 2003). En cuanto al término coeficiente de variación (CV), es un coeficiente que se emplea para expresar la precisión de una técnica o el grado de concordancia entre los resultados de pruebas independientes obtenidos en condiciones determinadas (Montero, 2001).

Así, en la validación se realiza el estudio de los parámetros que pueden influir en el resultado. El objetivo final es conocer el método, fijar los criterios que debe cumplir y declarar su validez con respecto al final que se persigue con su aplicación.

II. OBJETIVOS

La detección de residuos de agentes antimicrobianos de origen animal dentro del Plan Nacional de Investigación de Residuos (Directiva 96/23/CEE), así como la adecuación de la leche a la calidad exigida comunitariamente (Directivas 92/46/CEE y 94/71/CEE) y el establecimiento del precio de la leche que recibirá el ganadero, necesitan un sistema de control que permita la detección de leche con cantidades de residuos por encima de los Límites Máximos de Residuos (LMRs) señalados por la legislación.

Ante la posible falta de fiabilidad de los métodos para la determinación de inhibidores en la leche de oveja, el escaso número de trabajos efectuados en esta especie y los inconvenientes que originan la presencia de sustancias inhibidoras, tanto para la salud humana como para los procesos tecnológicos, se planteó la necesidad de realizar un estudio sobre un método específico de cribado para la detección de inhibidores (Eclipse[®] "100ov"), así como la validación de una técnica microbiológica multiresiduo (SMMP) para la identificación preliminar de residuos en la leche de oveja.

Por ello, los objetivos planteados en el presente trabajo, han sido:

- ✓ Evaluar la respuesta del método Eclipse[®] "100ov" en la detección de sustancias inhibidoras para el caso concreto de la leche de oveja.
- ✓ Determinar los límites de detección de algunos antibióticos y sulfonamidas mediante el método Eclipse[®] "100ov", así como establecer comparaciones entre los límites obtenidos mediante clasificaciones visuales y lecturas realizadas fotométricamente.
- ✓ Valorar la respuesta de un Sistema Microbiológico Multiplaca (SMMP) para la detección e identificación preliminar de residuos de sustancias antimicrobianas en el caso concreto de la leche de oveja.
- ✓ Establecer los límites de detección del SMMP de algunos antibióticos y sulfonamidas más empleados en el tratamiento de enfermedades infecciosas del ganado ovino.
- ✓ Estudiar la especificidad del SMMP evaluando la presencia de resultados "falsos positivos", así como la existencia de interferencias entre los diferentes grupos de sustancias antimicrobianas.

De este modo se pretende mejorar las condiciones del análisis empleado en la detección de residuos de medicamentos en la leche, brindando un instrumento más fiable a las industrias lácteas que utilizan leche de oveja para la elaboración de quesos, así como a los laboratorios responsables del control de calidad.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

Este trabajo, consta de dos estudios, en el primero de ellos se ha evaluado el método microbiológico de cribado Eclipse® “100ov” mientras que en el segundo se ha realizado la puesta a punto y validación del sistema multirresiduo conocido como “Sistema Microbiológico Multiplaca” (SMMP), ambos en el caso concreto de la leche de oveja. El desarrollo experimental de estos dos estudios, se describe a continuación.

1. PRIMER ESTUDIO: EVALUACIÓN DEL MÉTODO MICROBIOLÓGICO DE CRIBADO ECLIPSE® “100ov” EN LA LECHE DE OVEJA

1.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

El presente trabajo de investigación ha sido realizado en el laboratorio, granjas y demás dependencias de la Unidad de Producción Animal del Departamento de Ciencia Animal de la Universidad Politécnica de Valencia.

Por otra parte, el objetivo de este experimento ha sido evaluar la respuesta del método Eclipse “100ov” en la detección de sustancias inhibitoras, en el caso concreto de la leche de oveja, para lo que se han realizado una serie de actividades que se presentan en los apartados siguientes.

1.1.1. Selectividad del método microbiológico Eclipse® “100ov”

En esta primera etapa se utilizaron un total de 85 ovejas de las que se recogieron muestras de leche a partir de los 45 días hasta el final de la lactación (135 días postparto) a lo largo del ciclo de lactación. Cada muestra se fraccionó en dos alícuotas (leche sin conservante y leche con azidiol). Las distintas alícuotas, fueron analizadas, por duplicado, mediante el método microbiológico Eclipse® “100ov”.

Estas muestras de leche se utilizaron para evaluar la selectividad del método microbiológico Eclipse® “100ov”, así como analizar el efecto que produce la adición del conservante azidiol sobre los resultados del método y la influencia de la diferente composición de la leche a lo largo de la lactación.

1.1.2. Límites de detección del método microbiológico Eclipse® “100ov”

Para el cálculo de los límites de detección del método Eclipse® “100ov” se ensayaron diferentes agentes antimicrobianos a distintas concentraciones, y se recogieron un total de 60 muestras de leche de oveja, procedentes de animales que se encontraban a mitad del período de lactación.

Las muestras se llevaron al laboratorio de Producción Animal donde se realizaron los siguientes análisis:

- Análisis físico-químicos. Se determinaron el contenido en materia grasa, proteínas, lactosa, sólidos totales y sólidos no grasos por espectroscopia de infrarrojo, para verificar que las muestras de leche correspondían a los valores habituales de la raza.
- Recuento de células somáticas. Se eliminaron aquellas muestras de leche que contenían una cantidad de células superior a 250.000 células/mL.
- Análisis microbiológicos (ufc/mL). Se emplearon aquellas muestras que presentaban un contenido inferior a 500.000 ufc/mL.
- Test de detección de inhibidores mediante el Eclipse® “100ov”. Se utilizaron muestras que presentaban resultados negativos con este método.

Se seleccionaron aquellas muestras de leche que presentaban una composición química entre los valores habituales de la raza y una calidad higiénico-sanitaria adecuada. A partir de estas muestras seleccionadas se preparó una mezcla que bien homogeneizada se repartió en alícuotas de 100 mL que se congelaron a -37°C hasta el momento de su análisis.

1.2. MATERIAL

1.2.1. Muestras de leche

1.2.1.1. Obtención y preparación de las muestras

Las muestras de leche procedían de ovejas de raza Manchega del rebaño experimental que dispone el Departamento de Ciencia Animal. Estas muestras se recogieron en el ordeño mecánico de la mañana, utilizando botes de plástico de un solo uso para evitar contaminaciones; y todas ellas procedían de animales sanos, que no habían sido tratados con fármacos ni recibieron alimentación medicada durante el tiempo que duró el experimento.

El mismo día de la recogida de las muestras se les realizaron los análisis físico-químicos y los recuentos de células somáticas y bacteriológicos, con el fin de desechar aquellas muestras que no cumplieran los criterios establecidos.

1.2.1.2. Preparación del conservante

El azidol es un conservante que tiene por función inhibir el crecimiento bacteriano de la leche. Su utilización está muy extendida en la toma de muestras de muchos laboratorios lactológicos para poder realizar algunas de las determinaciones analíticas después de un determinado periodo de tiempo.

Los reactivos y cantidades necesarias para la preparación de un litro de azidiol fueron los siguientes:

- 1 gramo de cloranfenicol (Fluka Ref. 23275)
- 10 mililitros de etanol (Panreac Ref. 141086)
- 24 gramos de azida sódica (Merck Ref. 822335)
- 30 gramos de citrato trisódico 5,5 hidratado (Merck Ref. 6431)
- 0,35 gramos de azul de bromofenol (Merck Ref. 8122)
- 1 litro de agua destilada estéril.

Para la preparación de la disolución de conservante se esterilizó en un autoclave 1 litro de agua destilada durante 15 minutos a $120\pm 1^{\circ}\text{C}$. Se dejó enfriar y se mantuvo en un baño de agua a 50°C .

Se pesó 1 gramo de cloranfenicol y se disolvió en 10 mL de etanol. Una vez disuelto se le añadió aproximadamente unos 600 mL de agua destilada estéril y después 25 gramos de azida sódica y 30 gramos de citrato sódico. Se mantuvo en baño de agua hasta la perfecta disolución de los ingredientes. Se dejó enfriar y se completó con agua destilada hasta 1000 mL. Por último se añadieron 0,35 gramos de azul de bromofenol.

A cada muestra se le adicionó 0,2 mL de la disolución de azidiol por cada 50 mL de leche.

1.2.2. Disoluciones de fármacos y muestras fortificadas

Para el cálculo de los límites de detección se utilizaron 27 agentes antimicrobianos (10 betalactámicos, 4 aminoglucósidos, 3 macrólidos, 4 quinolonas, 4 tetraciclinas y 4 sulfonamidas) empleados en los tratamientos veterinarios del ganado ovino.

Las diferentes sustancias antimicrobianas utilizadas en esta etapa experimental, así como su procedencia comercial y el disolvente más adecuado en cada caso quedan reflejados en el Cuadro 18. Mientras que las concentraciones empleadas de dichos fármacos se muestran en el Cuadro 19.

En la determinación de los límites de detección de las diferentes sustancias, se prepararon disoluciones en el momento de efectuar los análisis, que fueron utilizadas dentro de las dos horas posteriores a su elaboración, a fin de evitar cualquier alteración por el tiempo y/o por la acción de la luz.

Para la preparación de las diluciones se pesó en una balanza analítica, $0,05\text{ g} \pm 0,001\text{ g}$ de cada sustancia (teniendo en cuenta la pureza que informaba el fabricante), y se disolvió en un matraz de 50 mL, utilizando el disolvente más adecuado para cada sustancia (Cuadro 18). De esta manera se obtuvieron las disoluciones madre o "stock" con una concentración de 1000 mg/kg. A partir de esta "disolución stock" de cada antibiótico, se prepararon disoluciones intermedias A, B y C, que correspondían a las concentraciones de 100, 10 y 1 mg/kg.

Cuadro 18. Antimicrobianos y disolventes empleados

	Sustancias	Disolvente	Ref. comercial
<u>Betalactámicos</u>	Penicilina G	H ₂ O	Sigma PEN-Na
	Amoxicilina	H ₂ O	Sigma A-8523
	Cloxacilina	H ₂ O	Sigma C-9393
	Oxacilina	H ₂ O	Sigma O-1002
	Cefadroxilo	H ₂ O	Sigma C-7020
	Cefalexina	H ₂ O	Sigma C-4895
	Cefoperazone	H ₂ O	Sigma C-4292
	Cefuroxime	H ₂ O	Sigma C-4417
<u>Aminoglucósidos</u>	Gentamicina	H ₂ O	Sigma G-3632
	Kanamicina	H ₂ O	Sigma K-4000
	Neomicina	Buffer fosfato pH 8	Sigma N-1876
	Estreptomina	H ₂ O	Sigma S-6501
<u>Macrólidos</u>	Eritromicina	Metanol	Sigma E-6376
	Espiramicina	Buffer fosfato pH 8	Sigma S-9136
	Tilosin	Metanol	Sigma T-6134
<u>Quinolonas</u>	Ciprofloxacina	NaOH 0,1 N	Bayer
	Enrofloxacina	NaOH 0,1 N	Bayer
	Flumequina	NaOH 0,1 N	Sigma F-7016
	Norfloxacina	NaOH 0,1 N	Sigma N-9890
<u>Tetraciclinas</u>	Clortetraciclina	NaOH 0,1 N	Sigma C-4881
	Doxiciclina	H ₂ O	Sigma D-9891
	Oxitetraciclina	HCl 0,1N	Sigma O-5750
	Tetraciclina	HCl 0,1N	Sigma T-3258
<u>Sulfonamidas</u>	Sulfadimetoxina	H ₂ O	Sigma S-7385
	Sulfametazina	Metanol	Sigma S-5637
	Sulfanilamida	NaOH 0,1 N	Sigma S-9251
	Sulfatiazol	H ₂ O	Sigma S-0127

Las muestras fortificadas de leche, se prepararon en matraces aforados de 10 mL. Para cada caso se tomó, con ayuda de una micropipeta, la cantidad necesaria de las disoluciones intermedias de antibiótico preparadas anteriormente (A, B, C, "stock"), siguiendo las recomendaciones de la FIL (1997), en donde se indica que la cantidad de estas disoluciones intermedias no debe superar el 1% del volumen de disolución final de leche.

De cada uno de los fármacos estudiados se prepararon 7 concentraciones y una muestra de leche sin la adición del fármaco, que se utilizó como control negativo. Las concentraciones empleadas se encuentran recogidas en el Cuadro 19.

Las determinaciones se efectuaron sobre 24 repeticiones para cada concentración, y el control.

Cuadro 19. Concentraciones de sustancias antimicrobianas

Sustancias	Concentraciones (mg/kg ó * mg/kg)	
<u>Betalactámicos</u>	Penicilina G	0 2,5 5 7,5 10 12,5 15 20
	Amoxicilina	0 2 3 4 5 6 8 10
	Cloxacilina	0 10 20 40 50 60 80 100
	Oxacilina	0 10 20 40 50 60 80 100
	Cefadroxilo	0 60 80 100 120 150 200 400
	Cefalexina	0 20 40 60 80 100 200 300
	Cefoperazone	0 40 60 80 100 200 300 400
	Cefuroxime	0 40 60 80 100 200 300 400
<u>Aminoglucósidos</u>	Gentamicina	0 0,5 1 1,5 2 2,5 3 6 (*)
	Kanamicina	0 5 7,5 10 15 20 40 60 (*)
	Neomicina	0 1 2 3 4 6 8 10 (*)
	Estreptomina	0 2 4 6 8 10 15 20 (*)
<u>Macrólidos</u>	Eritromicina	0 200 300 400 500 600 800 1000
	Espiramicina	0 10 12 15 18 20 30 40 (*)
	Tilosin	0 2,5 5 7,5 10 25 50 100
<u>Quinolonas</u>	Ciprofloxacina	0 2 3 4 5 6 8 10 (*)
	Enrofloxacina	0 2 3 4 5 6 8 10 (*)
	Flumequina	0 50 75 100 125 150 200 400 (*)
	Norfloxacina	0 2 4 6 8 10 12 15 (*)
<u>Tetraciclinas</u>	Clortetraciclina	0 0,5 1 1,5 2 2,5 3 4 (*)
	Doxiciclina	0 50 100 150 200 250 400 600
	Oxitetraciclina	0 100 200 400 600 800 1500 2000
	Tetraciclina	0 100 200 400 600 800 1500 2000
<u>Sulfonamidas</u>	Sulfadimetoxina	0 25 50 75 100 200 400 800
	Sulfametazina	0 50 100 200 400 600 800 1200
	Sulfanilamida	0 25 50 75 100 200 400 800
	Sulfatiazol	0 25 50 75 100 200 400 800

1.3. MÉTODOS ANALÍTICOS

1.3.1. Composición y calidad higiénica de la leche

Los análisis de composición, la cantidad de células somáticas y el recuento bacteriano fueron realizados en el Laboratorio Interprofesional de la Comunidad Valenciana (LICOVAL), situado en la Universidad Politécnica de Valencia.

1.3.1.1. Composición química

El análisis de la composición química de la leche se llevó a cabo en todas las muestras mediante un equipo automático Milko Scan FT 120 (Foss Electric, Hillerød, Dinamarca) previo calentamiento a 40°C y agitación de la leche antes de su análisis.

El Milko Scan FT 120 es un equipo basado en la espectroscopía de infrarrojo, que utiliza la banda de infrarrojo medio, concretamente entre 10,8 y 2 μm de longitud de onda. Además posee un interferómetro de modo que mediante la Transformada de Fourier, es capaz de obtener la absorbancia de toda la banda de infrarrojos señalada anteriormente.

El equipo había sido calibrado previamente para la leche de oveja y periódicamente se controlaba la calibración mediante los métodos oficiales de análisis o de referencia. Los resultados analíticos se expresan en gramos del correspondiente componente por 100 mL de leche.

1.3.1.2. Recuento de células somáticas

Para la realización del recuento celular se utilizó un equipo Fossomatic 90 (Foss Electric, Hillerød, Dinamarca), siguiendo la metodología descrita por la Federación Internacional de Lechería (FIL, 1984).

El equipo empleado fue un microscopio de funcionamiento continuo, a través del cual se realizó el recuento de las células que previamente fueron marcadas con un colorante fluorescente (bromuro de etidio). Cada célula somática produce un impulso eléctrico que es ampliado y recogido como una señal.

Previamente al análisis de las muestras, se procedió a calentarlas en un baño de agua a 40°C y homogeneizarlas. Seguidamente, con la ayuda de una micropipeta se depositaron 500 μL de leche en la cámara de admisión del equipo, donde se produce la mezcla con el bromuro de etidio.

Las lecturas que se observan en el lector digital del equipo deben multiplicarse por 1000 para expresar los resultados en células/mL de leche.

1.3.1.3. Recuento de bacterias

Mediante el recuento de bacterias (ufc) se controlaron los gérmenes mesófilos totales a 30°C. Para la realización de este recuento se utilizó el método de siembra en placa que se efectúa utilizando una placa de cultivo para cada dilución decimal.

La siembra se realizó el mismo día de la toma de muestras y el resultado se expresa en unidades formadoras de colonia por mililitro (ufc/mL).

Los reactivos utilizados fueron: disolución diluyente o disolución Ringer (Oxoid, Ref. BR52) y medio de cultivo que se obtuvo disolviendo 14,1 g de

Plate Count Agar (Difco, Ref. 247940) y 0,6 g de leche desnatada deshidratada en 600 mL de agua destilada. Una vez preparada la solución Ringer y el medio de cultivo se esterilizó el autoclave (15 minutos a $120\pm 1^\circ\text{C}$). Finalizada la esterilización del medio de cultivo se enfrió a $45-50^\circ\text{C}$ antes de su utilización.

A continuación se diluyó 1 mL de muestra de leche con 9 mL del diluyente, a fin de obtener una dilución 1:10. Se tomó 1 mL de esta disolución y otros 9 mL de diluyente y así sucesivamente hasta obtener una dilución 10^{-4} . En un ambiente estéril se depositó 1 mL de cada dilución en placas Petri estériles, por duplicado y se añadió 10 mL de medio de cultivo a cada una de las placas.

Se dejó solidificar la mezcla de las placas de Petri sobre una superficie horizontal, para después colocarlas invertidas en estufa a 30°C durante 72 horas. Posteriormente se procedió al conteo de las unidades formadoras de colonia (ufc) desarrolladas durante la incubación.

Se tomó como válida la dilución que presentó un recuento comprendido entre 30-300 ufc. El número de "unidades formadoras de colonias" por mL (ufc/mL) viene dado por:

$$\text{ufc/mL} = \text{número de ufc contadas en la placa} \times 10^n$$

Siendo n el valor absoluto de la dilución.

1.3.2. Método de detección de Inhibidores

1.3.2.1. Características del método Eclipse[®]

El método Eclipse[®] desarrollado y comercializado por la empresa Z.E.U.-Inmunotec S. L. (Zaragoza), es un método para la detección cualitativa de inhibidores en la leche cruda y leche tratada térmicamente, es decir, comprueba que la leche no contiene cantidades de antimicrobianos superiores a los niveles de detección.

Este método utiliza un gel de agar con una suspensión de esporas de *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C953 y un indicador ácido-base. Este procedimiento está basado en el método adoptado por la Unión Europea en la Decisión de la Comisión 91/180/CEE de 14 febrero de 1991 para la detección de antibióticos y sulfonamidas en la leche cruda y tratada térmicamente.

Los restos de medicamentos presentes en la leche difunden en el medio de reacción de agar que constituye el método, inhibiendo el metabolismo del microorganismo de prueba.

Por este motivo, en caso de estar presente alguna sustancia inhibidora en la leche, no se producirá el desarrollo del *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C953 y en consecuencia no se observarán cambios en el indicador ácido-base presente en el medio, permaneciendo con su color azul original.

En el caso de que la leche no posea residuos de inhibidores, se producirá el desarrollo del *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* y el consiguiente cambio en la coloración del indicador ácido-base presente en el medio, que mostrará un cambio de color (amarillo), poniendo de manifiesto el desarrollo microbiano y la ausencia de inhibidores en la muestra de leche.

Tras el tiempo de incubación la interpretación de los resultados de forma resumida es:

Color amarillo: “negativo”
Color azul-violeta: “positivo”
Color intermedio: “dudoso”

En la Figura 13 se puede apreciar una placa del método Eclipse® después de su utilización, donde se observan las distintas tonalidades de color que presentan los resultados.

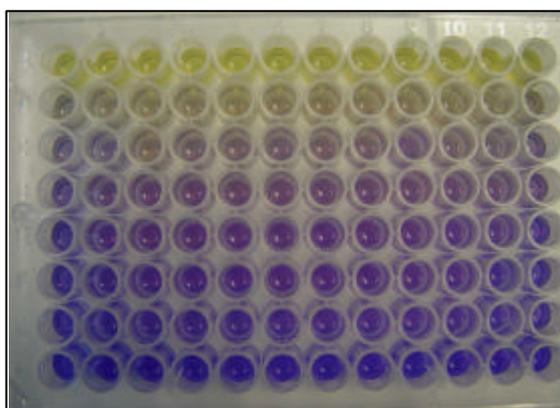


Figura 13. Placa de Eclipse® después de su utilización

El fabricante recomienda aplicar siempre un control negativo utilizando leche carente de antibióticos y un control positivo empleando leche con una cantidad de 4µg/kg de penicilina “G”, junto con el resto de muestras a analizar, a fin de determinar el tiempo óptimo de incubación y observar la diferencia de coloración de las muestras.

El método utilizado en este experimento fue la versión comercializada para el análisis de la leche de oveja (Eclipse “100ov”), que viene acompañado de una disolución suministrada por la casa fabricante denominada “100ov” que debe mezclarse con la leche en una relación 1:1 para analizar posteriormente.

1.3.2.2. Procedimiento del método

Para la preparación de las muestras de leche se siguió la metodología propuesta por el fabricante, añadiendo a un volumen determinado de leche la misma cantidad de la "solución 100ov", proporcionada junto al método. Una vez preparada se colocaron 100 µL de la mezcla en cada uno de los pocillos de la microplaca como se señala en el esquema recogido en la Figura 14.

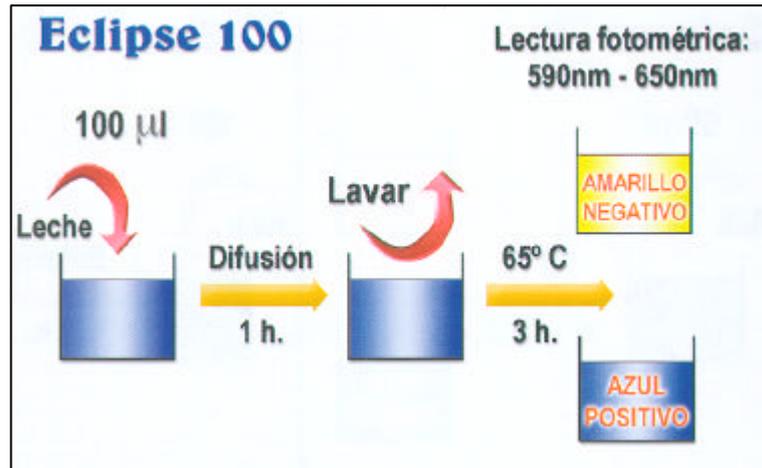


Figura 14. Esquema del procedimiento utilizado en el método Eclipse®

Fuente: ZEU-Inmunotec (2001)

A continuación se dejaron las placas a temperatura ambiente durante una hora, con el propósito de favorecer la difusión de la leche en el medio de cultivo. Posteriormente se incubaron en estufa a 65°C, durante 2,5-3 horas (hasta el cambio de color del control negativo). Transcurrido este tiempo se procedió a la interpretación de los resultados de modo visual por tres operadores entrenados y a su vez mediante un lector óptico para placas Elisa (Wallac 1420, Victor Multilabel Counter).

El equipo fotométrico utiliza un sistema óptico que se caracteriza por presentar múltiples canales, que le permiten iluminar en tiempos muy breves cada pocillo con una radiación de una longitud de onda seleccionada previamente. A partir de las recomendaciones de la casa fabricante, las lecturas fotométricas se realizaron utilizando las longitudes de onda de 590 y 650 nm.

1.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados de las variables medidas fueron introducidos en una hoja de cálculo Excel® (Excel, 1997) y posteriormente transformados a datos SAS® (SAS, 1998) para su análisis estadístico.

El análisis estadístico utilizado en el estudio de los factores de variación sobre las respuestas cualitativas (calificaciones visuales) o cuantitativas (absorbancias) del método de detección de inhibidores se realizó de acuerdo a los diferentes modelos que se comentan a continuación, utilizando distintos procedimientos del paquete estadístico SAS® (SAS, 1998).

1.4.1. Selectividad del método microbiológico Eclipse® “100ov”

La utilización de un modelo de regresión lineal no resulta adecuado cuando se utiliza una escala ordinal a tres niveles (negativo, dudoso, positivo), motivo por el cual resulta más conveniente la utilización de un modelo de regresión logística multinominal.

Para ello se aplicó el procedimiento LOGISTIC del paquete estadístico SAS® (SAS,1998).

El análisis estadístico utilizado para estudiar los efectos de los factores en la respuesta del método Eclipse®, se realizó según el siguiente modelo:

$$L_{ijk} = \text{logit} [P_{ijk}] = \beta_0 + \beta_1 AC_i + \beta_2 EL_j + \beta_3 (AC*EL)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

$L_{ijk} = \ln [P_{ijk} / (1 - P_{ijk})]$; $[P_{ijk}]$ = probabilidad de respuesta “positiva” y $[1 - P_{ijk}]$ = probabilidad de una respuesta “negativa”;

$\beta_0, \beta_1, \beta_2$ y β_3 = parámetros estimados del modelo

AC_i = efecto del conservante, expresado en términos de variables Dummy ($z=0$: sin conservante; $z=1$: con conservante)

EL_j = efecto del estado de lactación ($n=7$)

$(AC*EL)_{ij}$ = interacción entre el conservante y el estado de lactación

ε_{ijk} = error residual.

1.4.2. Límites de detección del método microbiológico Eclipse® “100ov”

El modelo empleado para estudiar el efecto de la concentración de un fármaco sobre la respuesta del método fue el siguiente:

$$L_{ij} = \text{logit} [P_{ij}] = \beta_0 + \beta_1 CF_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

$L_{ij} = \ln [P_{ij} / (1 - P_{ij})]$; $[P_{ij}]$ = probabilidad de respuesta “positiva” y $[1 - P_{ij}]$ = probabilidad de una respuesta “negativa”;

β_0 y β_1 = parámetros estimados del modelo

CF_i = concentración del fármaco ($i=5$)

ε_{ij} = error residual.

Se determinó el porcentaje de concordancia (C) del modelo, como un parámetro indicador del ajuste logrado. En este sentido, se dice que existe una concordancia entre el valor predicho por el modelo y el valor determinado experimentalmente, cuando la frecuencia de las respuestas positivas tiene una probabilidad de predicción más grande que la frecuencia de las respuestas experimentales, mientras que para las calificaciones negativas ocurre lo contrario.

El cálculo de los límites de detección se efectuó de acuerdo con diferentes criterios, según se hubieran establecido los resultados a partir de las calificaciones visuales o lecturas fotométricas.

El límite de detección para las calificaciones visuales se establece como el valor de la concentración que produce el 95% de respuestas positivas (Suhren y Heeschen 1993; Suhren, 1997; Reichmuth *et al.*, 1997; Suhren *et al.*, 1997; Sternesjo y Johsson, 1998).

Cuando se utilizan mediciones fotométricas de las absorbancias, el límite de detección se establece como el valor de la concentración del fármaco para el cual se alcanza el 45% de la máxima absorbancia relativa porcentual (Luitz y Suhren, 1995; Suhren, 1995; Luitz *et al.*, 1996; Schliephake, 1996).

Esta definición obliga a realizar una conversión de los valores de absorbancias absolutas de las lecturas fotométricas del método microbiológico a una escala porcentual, según la siguiente transformación:

$$A = \frac{A_x - A_0}{A_{100} - A_0} \times 100$$

Donde:

A= absorbancia relativa porcentual

A₀ = absorbancia de las muestras de leche sin incorporación de sustancia antimicrobiana

A₁₀₀ = absorbancia de las muestras de leche con una concentración de fármaco tal que impida el crecimiento del microorganismo

A_x = absorbancia de una muestra de leche con una concentración "x" del fármaco

El análisis estadístico utilizado para la determinación de los límites de detección de los diferentes fármacos a partir de las calificaciones visuales o las medidas fotométricas de las absorbancias se realizó mediante el procedimiento LOGISTIC del paquete estadístico SAS® (SAS, 1998).

2. SEGUNDO ESTUDIO: APLICACIÓN DEL SISTEMA MICROBIOLÓGICO MULTIPLACA (SMMP) EN LA LECHE DE OVEJA

Este trabajo ha sido realizado en la granja experimental de ganado ovino y en los laboratorios de la Unidad de Producción Animal del Departamento de Ciencia Animal de la Universidad Politécnica de Valencia, así como en el laboratorio de Microbiología perteneciente al área de Salud Pública de la Consellería de Sanidad de la Generalitat Valenciana.

2.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

2.1.1. Efecto de la naturaleza de la leche en el SMMP

Para estudiar el efecto del tipo de leche en el Sistema Multirresiduo o Multiplaca" desarrollado para la leche de vaca (Nouws *et al.*, 1999a,b) y

aplicado en el caso concreto de la leche de oveja, se planteó el presente experimento, donde se compararon las respuestas de diferentes sustancias antimicrobianas presentes en la leche de las dos especies comentadas.

En cada grupo de antimicrobianos estudiados, se eligió una sustancia representativa del grupo, a una concentración determinada, siempre y cuando presentaran un halo de inhibición detectable. Estas sustancias fueron:

- Betalactámicos: Penicilina G (3 $\mu\text{g}/\text{kg}$)
- Aminoglucósidos: Neomicina (200 $\mu\text{g}/\text{kg}$)
- Macrólidos: Espiramicina (150 $\mu\text{g}/\text{kg}$)
- Quinolonas: Flumequina (400 $\mu\text{g}/\text{kg}$)
- Sulfonamidas: Sulfametazina (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$)
- Tetraciclinas: Oxitetraciclina (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$)

En la Figura 15, se detalla un esquema del experimento, donde se puede observar que se prepararon ocho placas para cada sustancia estudiada. En cada placa, se colocaron 6 muestras de leche, 3 de oveja y las otras 3 de vaca (UHT); una de cada especie no presentaba antibiótico adicionado (muestras negativas), y al resto se le adicionó el antibiótico a estudiar.

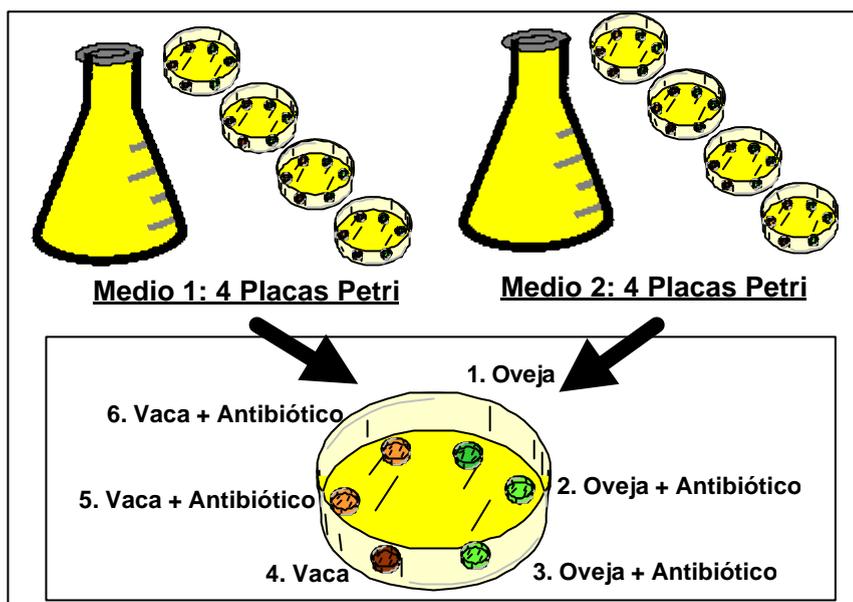


Figura 15. Diseño experimental empleado en el estudio del tipo de leche

2.1.2. Adecuación del Sistema Microbiológico Multiplaca

2.1.2.1. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Antes de determinar los Límites de Detección (LD), se consideró necesario establecer la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de cada antibiótico, considerada como la concentración a la cual se forma un halo de inhibición apreciable.

Para ello, se realizó un experimento en el que, sobre una misma placa, se colocaron cinco muestras de leche con concentraciones crecientes, (siendo cada una de ellas el doble de la anterior), del antibiótico a ensayar, y una muestra de leche negativa (sin antibiótico adicionado). En el cálculo de la CMI de cada antimicrobiano las determinaciones se realizaron por duplicado, preparándose dos placas por sustancia.

En el Cuadro 20 se presentan los antibióticos y las concentraciones ensayadas para cada caso.

Cuadro 20. Concentraciones ensayadas para determinar la CMI

Sustancias	Concentraciones (mg/kg)
Penicilina G, Amoxicilina	2 4 8 16 32
Cloxacilina, Oxacilina	5 30 60 120 240
Eritromicina	20 40 80 160 320
Cefalexina, Cefadroxil, Cefoperazone, Cefuroxime	
Clortetraciclina, Doxiciclina, Ciprofloxacina	25 50 100 200 400
Norfloxacina, Enrofloxacina	
Espiramicina, Gentamicina	50 100 200 400 800
Tetraciclina, Oxitetraciclina, Sulfametacina, Sulfatiazol, Sulfadimetoxina,	100 200 400 800 1600
Neomicina, Estreptomicina, Flumequina, Sulfanilamida	200 400 800 1600 3200
Tilosina	250 500 1000 2000 4000
Kanamicina	300 600 1200 2400 4800

2.1.2.2. Obtención de los Límites de Detección (LD)

Una vez hallada la Concentración Mínima Inhibitoria y teniendo en cuenta los Límites Máximos de Residuos que establece la Unión Europea, se procedió a diseñar este experimento siguiendo las directrices establecidas por la AOAC para métodos microbiológicos de detección de antibióticos (AOAC, 1995). Para ello, se prepararon 5 concentraciones de cada antibiótico, en orden creciente a partir de la CMI, siendo cada una de ellas el doble de la anterior.

Para evitar la preparación de una cantidad elevada de medio de cultivo donde la homogeneización del microorganismo resultara difícil y por tanto el reparto en las placas diera lugar a concentraciones diferentes del biosensor, se prepararon diferentes porciones de medio de cultivo.

En la Figura 16 se presenta un esquema simplificado de este diseño, donde se observa que se prepararon 3 frascos con el medio de cultivo específico para cada grupo de antimicrobianos. De cada frasco se obtuvieron 4 placas, es decir se emplearon un total de 12 placas por cada antimicrobiano.

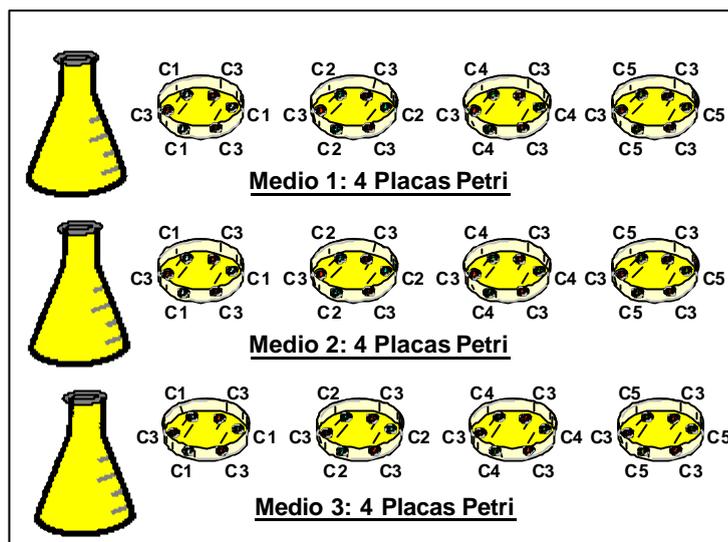


Figura 16. Diseño experimental empleado para estudiar los límites de detección del SMMP en leche de oveja

En cada una de las placas, se colocó por triplicado la concentración intermedia (C3), que se consideró como testigo, para poder efectuar las correcciones (AOAC, 1995) y análisis estadísticos de los resultados. Otros tres pocillos de cada placa se emplearon para el estudio de cada una de las concentraciones (C1, C2, C4 y C5). De esta manera, se obtuvieron 9 valores para cada concentración ensayada y 36 valores de la concentración considerada como testigo.

Las características de las sustancias antimicrobianas empleadas ya han sido descritas en el primer experimento (Cuadro 18). Mientras que las concentraciones ensayadas en este experimento se encuentran recogidas en el Cuadro 21.

2.1.3. Especificidad del SMMP aplicado a leche de oveja

2.1.3.1. Selectividad del SMMP

A fin de poder establecer la influencia de la composición de la leche, así como la presencia de inhibidores naturales sobre el SMMP que puede reflejarse en la aparición de resultados “falsos positivos” se llevó a cabo un estudio de selectividad.

Para este estudio se emplearon muestras individuales de leche procedentes de 100 animales no tratados que se encontraban en diferentes momentos del estado de lactación y que fueron recogidas evitando cualquier tipo de contaminación.

Se prepararon dos placas para cada grupo de antimicrobianos que constituyen el SMMP y se sembraron las muestras por duplicado.

Los resultados se evaluaron teniendo en cuenta los diámetros menores de 16 mm, entre 16-18 mm y superiores a 18 mm.

Cuadro 21. Concentraciones ensayadas para establecer la linealidad del SMMP y los límites de detección.

Sustancias	Concentraciones (mg/kg)	
<i>Betalactámicos</i>	Penicilina G	2 4 8 16 32
	Amoxicilina	2 4 8 16 32
	Cloxacilina	15 30 60 120 240
	Oxacilina	15 30 60 120 240
	Cefadroxilo	25 50 100 200 400
	Cefalexina	25 50 100 200 400
	Cefoperazone	25 50 100 200 400
	Cefuroxime	25 50 100 200 400
<i>Aminoglucósidos</i>	Gentamicina	50 100 200 400 800
	Kanamicina	300 600 1200 2400 4800
	Neomicina	200 400 800 1600 3200
	Estreptomycin	800 1600 3200 6400 12800
<i>Macrólidos</i>	Eritromicina	20 40 80 160 320
	Espiramicina	100 200 400 800 1600
	Tilosina	250 500 1000 2000 4000
<i>Quinolonas</i>	Ciprofloxacina	25 50 100 200 400 800
	Enrofloxacin	25 50 100 200 400 800
	Flumequina	400 800 1600 3200 6400
	Norfloxacin	25 50 100 200 400 800
<i>Tetraciclinas</i>	Clortetraciclina	25 50 100 200 400
	Doxiciclina	25 50 100 200 400
	Oxitetraciclina	100 200 400 800 1600
	Tetraciclina	100 200 400 800 1600
<i>Sulfonamidas</i>	Sulfadimetoxina	100 200 400 800 1600
	Sulfametazina	100 200 400 800 1600
	Sulfanilamida	200 400 800 1600 3200
	Sulfatiazol	100 200 400 800 1600

2.1.3.2. Especificidad cruzada

También para analizar las interferencias que pueden existir con el método de detección de un determinado grupo de residuos con el resto de sustancias pertenecientes a otros grupos farmacológicos se planteó este estudio de “especificidad cruzada”.

Para ello, se prepararon placas correspondientes a la detección de un determinado grupo de fármacos y se ensayaron todo el resto de antimicrobianos estudiados, excepto los pertenecientes al grupo cuya placa se estaba evaluando.

De cada sustancia se ensayaron concentraciones calculadas a partir de la concentración que producía una zona de inhibición de 18 mm (C_{18}) obtenida del experimento anterior. Se utilizaron concentraciones correspondientes a 1; 2,5; 5; 10; 20 y 40 veces la C_{18} .

Para cada fármaco se prepararon dos placas con el medio de cultivo correspondiente con el fin de evaluar por duplicado las seis concentraciones a analizar. Además para cada grupo específico del SMMP se elaboraron dos placas en las que se colocó como referencia tres muestras de leche negativas y otras tres fortificadas con la sustancia que se considera patrón para ese grupo (Nouws *et al.*, 1999a), a fin de comprobar que la placa se había preparado correctamente.

2.2. MUESTRAS DE LECHE

2.2.1. Obtención y preparación de las muestras

Para establecer los límites de detección se recogieron un total de 80 muestras que procedían del rebaño de ovejas del Departamento de Ciencia Animal.

Se seleccionaron aquellas muestras de leche que presentaban una composición química entre los valores habituales de la raza y una calidad higiénico-sanitaria adecuada (teniendo en cuenta los criterios establecidos en el apartado 1.1.2). Para llevar a cabo esta selección se utilizaron una serie de técnicas y equipos que se han detallado en el apartado 1.3. A partir de estas muestras seleccionadas se preparó la leche “control negativo” que se empleó como materia prima a lo largo de todo el experimento.

La leche control fue sometida a un tratamiento térmico para inactivar los posibles inhibidores naturales que podían causar alguna interferencia en los resultados. Este tratamiento se realizó en un baño de agua a $80 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 10 minutos.

En la determinación de la presencia de “falsos positivos”, se tomaron un total de 100 muestras procedentes de animales individuales, no tratados con sustancias farmacológicas, empleando material estéril de un solo uso en su recogida.

En lo que se refiere a las muestras de leche destinadas a las pruebas para estudiar la especificidad cruzada se recogieron y procesaron de igual forma que las empleadas en el cálculo de los límites de detección.

Las disoluciones de los antimicrobianos, así como las muestras de leche fortificadas, empleadas en este experimento se prepararon siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 1.2.2. de Material y Métodos.

2.2.2. Métodos analíticos

Los métodos analíticos empleados para la composición química, recuento de células somáticas, recuento de bacterias y detección de inhibidores, fueron los descritos en el apartado 1.3. de Material y metodos.

2.3. SISTEMA MICROBIOLÓGICO MULTIPLACA (SMMP)

2.3.1. Características del Sistema Microbiológico Multiplaca

El “Sistema Microbiológico Multiplaca” o multirresiduo es un método microbiológico desarrollado por Nouws *et al.* (1999a,b) en el “Instituto para la calidad de los productos alimentarios” del Ministerio de Agricultura holandés (Rijks-Kwaliteitsinstituut voor lan-en tuinbouw-producten, RIKILT-DLO) para la detección de sustancias inhibidoras en leche cruda, leche para consumo (sometida a algún tratamiento térmico para su conservación), y leche deshidratada; por lo tanto no es adecuado para el análisis de productos lácteos que hayan sufrido algún proceso de fermentación.

Este método detecta la presencia de residuos de diferentes grupos de antimicrobianos en la leche analizada a través de distintas placas con una composición determinada, a fin de optimizar las condiciones de crecimiento del microorganismo más sensible a cada grupo de sustancias.

2.3.2. Equipos, reactivos y materiales del SMMP

Los equipos necesarios para el desarrollo del bioensayo fueron los que se indican a continuación:

- Balanza analítica de precisión (Mettler AB 104-S)
- Agitador magnético (Macna, ANC-10)
- Baño termostático (Selecta Preciser 45L)
- pHmetro con baño termostático (GLP 21-Crison)
- Autoclave (Selecta Presoclave 75, LP)
- Campana de flujo laminar (Telstar AH-100)
- Estufas de incubación de flujo laminar (Selecta, Incudigit 80L)
- Calibre digital (Conecta, 5900601)

Los reactivos utilizados para la preparación del SMMP han sido los siguientes:

- $MnSO_4 \cdot H_2O$ (Panreac, Ref. PA-ACS 13413)
- Medio de cultivo Plate Count Agar (PCA, Difco[®], Ref. 247940)
- KH_2PO_4 (Panreac, Ref. PA 121509)
- Cloranfenicol (Sigma, Ref. C0378)
- Medio de cultivo Stándar II Nähr-agar (ST II, Merck[®], Ref. 107883)

- Medio de cultivo Muller Hinton Agar (MH, Merck[®] , Ref.105437)
- Medio de cultivo Muller Hinton Agar (MH, Oxoid[®] , Ref. CM 337)
- Sangre de caballo desfibrinada (Biomérieux, Ref. 55833)
- Extracto de carne (Merck[®] , Ref.103979)
- Trimetoprim (TMP, Sigma, Ref. T7883)
- Medio de cultivo caldo nutritivo nº 2 (Merck[®] , Ref.105450)

Los materiales específicos utilizados en el SMMP han sido:

- Placas de Petri de 140 mm y de 90 mm de diámetro
- Micropipetas automáticas de 200 µL, 1000 µL y 5000 µL
- Sacabocados metálico de 14 mm de diámetro interno
- Botes de vidrio de resistencia térmica
- Tubos de vidrio de tapón “sero-tab”

Además se empleó el material habitual del laboratorio (guantes de látex, pesa sustancias, viales eppendorf, probetas, matraces aforados, erlenmeyers, espátulas, pipetas de vidrio, etc.).

2.3.3. Preparación de las suspensiones bacterianas

2.3.3.1. Consideraciones previas

Teniendo en cuenta las especificaciones técnicas del método descrito por Nouws *et al.* (1999a,b), las suspensiones bacterianas de los distintos microorganismos empleados procedían de dos orígenes:

- Suspensiones suministradas por un distribuidor comercial (Merck[®]), contenidas en ampollas de vidrio con una concentración ajustada y definida en un intervalo muy cercano. Siendo estos microorganismos *B. subtilis* BGA (Merck[®] , Ref. 1.10649), *B. Stearothermophilus var. calidolactis* C953, (Merck[®] , Ref. 1.11499). Para poder emplear estas suspensiones, se verificaba previamente la concentración exacta a la que se encontraban, mediante recuento en placa con PCA. Una vez conocida ésta ya se utilizaba directamente en la placa en cuestión.
- Cepas de referencia procedentes de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Se presentan liofilizadas y contenidas en ampolla de vidrio. Éste es el caso de los microorganismos *B. cereus* ATCC 11778, *M. luteus* ATCC 9341 y *E. coli* ATCC 11303. En este origen hay que procesar el contenido de la ampolla para obtener una suspensión bacteriana del microorganismo en cuestión a la concentración que se precisa. Además, la metodología variará dependiendo de si éste es una forma esporulada (*B. cereus*), ó por el contrario es forma vegetativa o celular (*M. luteu* y *E. coli*).

2.3.3.2. Preparación de la suspensión bacteriana a partir de cepas liofilizadas de formas esporuladas

La preparación de la suspensión bacteriana de formas esporuladas, como es el caso del *B. cereus*, requiere de las siguientes etapas:

1.- Recuperación del cultivo liofilizado. Para poder recuperar este cultivo, se abrió la ampolla mediante una lima o diamante, y dejando que entrase el aire lentamente, se procedió a rehidratar la cepa añadiendo 1mL de caldo nutritivo nº 2 con una pipeta Pasteur y resuspendiendo bien todo el conjunto. A continuación se mantuvo en estufa a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ unos 30 minutos.

2.- Preparación del medio de esporulación. En la preparación del medio de esporulación, se utilizó agar nutriente con 31,3 mg de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ por litro. Se esterilizó en autoclave a $120 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 15 minutos. Una vez estéril se dosificó en cantidades de 75 mL en placas de 140 mm de diámetro.

3.- Cultivo y esporulación. Se tomó un volumen de 0,5 mL de suspensión inicial y se sembró con asa en superficie, en las placas con el medio de esporulación anteriormente preparado. Seguidamente se incubó a 30°C durante 24 h.

4.- Recogida de las esporas. Las esporas obtenidas se recogieron de la superficie del agar mediante la ayuda de una espátula, pipeta Pasteur y solución salina fisiológica (0,85% NaCl). La operación se repitió hasta recoger un volumen aproximado de 15 mL de suspensión bacteriana por placa.

5.- Observación de la esporulación. Se llevó a cabo una tinción simple para evaluar el grado de esporulación, y comprobar que el porcentaje de esporas era superior al 10% del total de bacterias.

6.- Lavados. La suspensión bacteriana se distribuyó en tubos de 10 mL, que fueron centrifugados a 3.000 g durante 10 minutos. A continuación mediante decantación se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento mediante suero fisiológico, volviéndose a centrifugar de nuevo. Esta operación se llevó a cabo unas 3-4 veces.

7.- Pasteurización. Con el objeto de mantener la suspensión bacteriana estable a lo largo del tiempo, siempre y cuando se proteja de la desecación y la deshidratación, se calentaron los tubos de vidrio que la contenían en baño de agua a 70°C durante 30 minutos.

8.- Contaje y ajuste de la concentración de esporas. La suspensión de esporas obtenida, se encontraba a una concentración muy superior a la de trabajo, por lo que fue necesario preparar una nueva disolución de esporas ajustada en el caso de *B. cereus* a 10^9 esporas/mL. Esto se llevó a cabo, rediluyendo la disolución inicial y haciendo un recuento en placa con PCA de diluciones seriadas en tubos con suero fisiológico.

9.- Conservación. Una vez ajustada la concentración de la suspensión, ésta se puede mantener en refrigeración (0-3 °C) durante un período al menos un año, efectuando controles de viabilidad cada tres meses.

2.3.3.3. Preparación de la suspensión bacteriana a partir de cepas liofilizadas de formas vegetativas

Para obtener la suspensión bacteriana procedente de una forma vegetativa como *M. luteus* y *E. coli*, se emplearon las siguientes etapas:

1.- Recuperación del cultivo liofilizado. En esta etapa se procede del mismo modo que para las formas esporuladas, descrita anteriormente.

2.- Preparación del medio de propagación. Para la preparación del medio de propagación, se utilizó Agar nutriente. Se esterilizó en autoclave a 120 ± 1 °C durante 15 minutos. Una vez estéril se dosificó en cantidades de 75 mL en placas de 140 mm de diámetro.

3.- Siembra y cultivo. Se llevó a cabo de igual modo que en las formas esporuladas.

4.- Recogida de las bacterias. Se recogió de la superficie del agar el microorganismo mediante la ayuda de espátula, pipeta Pasteur y 5-10 mL de disolución crioprotectora de glicerol-salino (15 mL de glicerol y 1% de solución salina, llevados hasta un volumen de 100 mL) estéril. La operación se repitió hasta recoger un volumen aproximado de 15 mL de suspensión bacteriana por placa y se depositó en tubos de centrifuga estériles.

5.- Lavados. La suspensión bacteriana se centrifugó a 3000 g durante 10 minutos, se lavó, tal y como se ha descrito para las formas esporuladas, sustituyendo el líquido de lavado por solución crioprotectora estéril.

6.- Ajuste de la concentración de la suspensión bacteriana. Para realizar un conteo de la cantidad de bacterias viables, se realizó un recuento normal en placa con PCA sembrando dos placas por dilución. Posteriormente se incubó en estufa 24-48 h a 30 °C. La concentración debe encontrarse en torno a 10^8 ufc/mL. En el caso en que la concentración fuese superior a la deseada, se volvía a rediluir con disolución crioprotectora y se hacía un recuento. Sin embargo si ésta resultaba inferior se centrifugaba para concentrar resuspendiendo con menor volumen de disolución crioprotectora y comprobando la concentración mediante recuento.

7.- Conservación. Una vez ajustada la suspensión bacteriana, se repartió en alícuotas en viales eppendorf estériles y se mantuvo en congelación a una temperatura de -20 ± 5 °C. Las cepas así conservadas se mantuvieron durante 6 meses, transcurridos los cuales se efectuaba un control de calidad verificando la viabilidad, la pureza del cultivo y la concentración a la que se encontraba.

2.3.4. Preparación de las placas

A continuación se detalla el procedimiento seguido para preparar las diferentes placas que constituyen el SMMP.

2.3.4.1. Placa de *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C953

La placa preparada con esporas de *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C953 está indicada para la detección de residuos de antibióticos betalactámicos.

En primer lugar se preparó el medio de cultivo. En este caso, se empleó PCA de Difco® liofilizado, y se disolvió en una proporción de 23,5 gramos por litro de agua destilada. Esta disolución se llevó a cabo en caliente y en permanente agitación, con el fin de facilitar el proceso. Una vez disuelto en su totalidad, se esterilizó en un autoclave, a 120 ± 1 °C durante 15 minutos. A continuación se atemperó a 50°C en un baño de agua y se ajustó el pH a $8,0 \pm 0,1$, en un pHmetro provisto de termostato.

Una vez preparado el medio de cultivo, se procedió a su inoculación con la suspensión de esporas, en condiciones estériles. La concentración final en placa debía ser de 10^7 esporas/mL.

Tras la adición del microorganismo en condiciones estériles, a los botes con los medios de cultivo, se agitaron moderadamente para conseguir su homogeneidad. Para obtener un espesor de 2,2 mm, se depositó en las placas de Petri (140 mm de diámetro) 32 mL de medio de cultivo.

Posteriormente se dejaron enfriar las placas, sobre una superficie plana nivelada con el fin de obtener una capa lo más uniforme posible. Una vez frío y solidificado, se realizaron los pocillos (de 14 mm de diámetro) con ayuda de un sacabocados y unas pinzas; los pocillos debían presentar una separación entre ellos de 3 cm para que los resultados no se superpusieran.

En cada pocillo, se dispusieron con micropipeta automática 250 μ L de muestra de leche fortificada con los antimicrobianos. A continuación, las placas con las muestras, se dejaron durante 30 minutos a temperatura ambiente para que tuviera lugar la predifusión de las mismas. Pasado ese tiempo, fueron colocadas en una estufa siguiendo las condiciones de tiempo y temperatura más adecuadas para el crecimiento de este microorganismo que fueron de 55 ± 1 °C durante 6 horas.

2.3.4.2. Placa de *Bacillus subtilis* BGA

El *Bacillus subtilis* BGA, es el microorganismo que se considera más sensible para la detección de los antibióticos aminoglucósidos, en las condiciones de esta placa. Este microorganismo, suministrado por la casa Merck, se obtiene ajustado a una concentración de 10^6 esporas/mL, que al diluirlo queda en la placa a una concentración de 10^4 esporas/mL.

En este caso se requiere preparar previamente una disolución 1M tris-buffer a pH 8,5, que se adicionará posteriormente a las muestras una vez han sido colocadas en los pocillos. Para ello, se pesan en balanza de precisión 121,14 g de tris-hidroxi-metil aminometano, se disuelven en 900 mL de agua destilada y se ajusta el pH a 8,5, finalmente se enrasa, en un matraz aforado, a un volumen de 1000 mL. Esta disolución es estable en temperaturas de refrigeración durante al menos 3 meses.

Se empleó como medio de cultivo, PCA de Difco siguiendo las recomendaciones de Nouws *et al.* (1999a,b), elaborado de igual forma que en la placa de betalactámicos.

El desarrollo de la metodología para obtener la placa final solidificada con la suspensión bacteriana coincide con el caso anterior, siendo esta vez el valor del pH ajustado de $8,0 \pm 0,1$.

Una vez preparada la placa, se adicionó la leche fortificada a los pocillos, y además un suplemento de 25 μ L de una disolución 1M tris-buffeer a pH 8,5. En este caso la temperatura de incubación fue de 30 ± 1 °C y el tiempo de 16-18 horas.

2.3.4.3. Placa de *Micrococcus luteus* ATCC 9341

El *Micrococcus luteus* ATCC 9341, es el microorganismo que se considera más adecuado para la detección del grupo de antibióticos macrólidos.

En este caso se emplea como medio de cultivo MH agar deshidratado (Merck). Para su preparación, se pesan en una proporción de 32 g/L y se disuelve con agua destilada en caliente con agitación magnética continua. A continuación se esterilizó, atemperó en baño con agua a 50°C y se ajustó el pH a $8,0 \pm 0,1$ en pHmetro provisto de termostato

La suspensión bacteriana de *M. luteus* procedía de la cepa de referencia de la CECT, y había sido preparada y ajustada previamente a la concentración de 10^8 esporas/mL. Se adicionó a los botes con el medio de cultivo quedando a una concentración de 10^6 esporas/mL, se homogeneizó el conjunto y a continuación se repartió en placas de Petri de 140 mm de diámetro, procediéndose de modo similar a los casos anteriores. Seguidamente se perforaron los pocillos en los que se colocó la leche fortificada y, después de 30 minutos a temperatura ambiente, las placas se incubaron a 30 ± 1 °C durante 16-18 horas.

2.3.4.4. Placa de *Escherichia coli* ATCC 11303

Este microorganismo se considera específico para la detección de quinolonas. Es proporcionado por la CECT y se emplea a una concentración de 10^8 ufc/mL en el agar y 10^6 ufc/mL en la placa.

Para esta placa se utiliza como medio de cultivo PCA (Difco), en una proporción de 22,5 g en un litro de agua destilada, además se le adiciona un 0,2% de extracto de carne. Con todo el conjunto se procede igual que en los casos anteriores, exceptuando el ajuste de pH que en esta ocasión fue de $6,0 \pm 0,1$.

La secuencia de preparación de esta placa, coincide con las descritas anteriormente, exceptuando que en ella se preparó una disolución 1M KH_2PO_4 a pH 6. Para ello se pesó 136,09 g de KH_2PO_4 que se disolvió con 900 mL agua destilada, se le ajustó el pH y se enrasó hasta 1000 mL, conservándose posteriormente en refrigeración. Esta disolución se empleó como suplemento añadido, después de la muestra de leche, en un volumen de 25 μL por pocillo. La temperatura y tiempo de incubación fue el mismo que el empleado para *M. luteus* (30 ± 1 °C, 16-18 horas).

2.3.4.5. Placa de *Bacillus cereus* var. *mycooides* ATCC 11778

El *Bacillus cereus* var. *mycooides* ATCC 11778 es el microorganismo que se considera más sensible para la detección de residuos de tetraciclinas. En este caso, la elaboración de esta placa, requería, la preparación de las siguientes disoluciones:

- ◆ Disolución 1M de dihidrógenofosfato de potasio (KH_2PO_4), ajustada a pH 6,0.
- ◆ Disolución de cloranfenicol (CAP “stock” 100 $\mu\text{g/g}$). Esta solución, se preparó disolviendo 5,0 mg de cloranfenicol (100 % puro), en 5 mL de metanol, y después se enrasó hasta 50 mL con agua destilada.
- ◆ Disolución de cloranfenicol (CAP “A” 20 $\mu\text{g/kg}$), preparada a partir de 10 mL de la solución CAP “stock” y enrasando hasta 50 mL con la solución 1M de dihidrogenofosfato de potasio (KH_2PO_4) 1 M.

El medio de cultivo utilizado fue Standard II Nähr-agar liofilizado. Para disolverlo, se utilizó agua destilada que contenía 0,1%, de KH_2PO_4 1 M, pesándose 25 g de medio por litro de agua; se disolvió en caliente. A continuación, se esterilizó, enfrió hasta 50 °C, se ajustó el pH a $6,0 \pm 0,1$ y se añadió 0,5% de CAP “stock”, adicionándolo por último el microorganismo.

Las esporas de *Bacillus cereus* que se utilizaron, procedían de una cepa de referencia de la CECT. En este caso concreto, la concentración final en placa que se debía alcanzar era de 10^5 esporas/mL.

Una vez preparada la placa con la leche en los pocillos se le añadió a cada uno de ellos, un suplemento de 25 μL de CAP “A”. En este caso, la temperatura y tiempo de incubación coincide con los casos anteriores siendo de 30 ± 1 °C durante 16-18 horas.

2.3.4.6. Placa de *Bacillus subtilis* BGA

El *Bacillus subtilis* BGA, en las condiciones de trabajo de esta placa, es sensible a la detección de sulfonamidas. Este microorganismo se obtiene de forma comercial (Merck) ajustado a una concentración de 10^6 esporas/mL y una vez en placa se presenta en una concentración de 10^4 esporas/mL.

Para preparar esta placa, se empleó como medio de cultivo MH agar de Oxoid en una proporción de 38 g/1000 mL de agua destilada con un suplemento de 0,1% KH_2PO_4 (previamente preparada). A continuación se esterilizó, se le ajustó el pH a $7,0 \pm 0,05$ y se adicionó un 3% de sangre de caballo y 0,45% de una disolución "A" de trimetoprim (TMP "A") que se prepara tal y como se detalla a continuación:

- ◆ Disolución "stock" de trimetoprim (TMP "stock" 50 $\mu\text{g/g}$). Para ello se pesaron 5 mg de TMP 100% de pureza que se disolvieron en 5 mL de metanol y se enrasaron con agua destilada hasta un volumen de 100 mL.
- ◆ Disolución "A" de trimetoprim (TMP "A" 10 $\mu\text{g/g}$). Se tomaron 10 mL de TMP stock y se enrasaron con 50 mL de agua destilada.
- ◆ Disolución "B" de Trimetoprim (TMP 1,6 $\mu\text{g/g}$). En este caso se tomó un volumen de 16 mL de TMP "A" y se enrasó a 100 mL con otra disolución de NaCl al 10% (preparada previamente) Esta solución TMP "B" se empleó como suplemento en los pocillos de la placa con las muestras de leche.

Una vez homogeneizado el medio de cultivo, la sangre de caballo, y la disolución de TMP "A", se adicionó el *B. subtilis* y la mezcla se repartió en placas procediendo, como en casos anteriores. A continuación, se adicionó la leche y 25 μL de TMP "B", se mantuvo 30 minutos a temperatura ambiente y se incubó, en este caso, a 37° C durante 16-18 horas.

2.3.5. Interpretación de los resultados

Transcurrida la etapa de incubación de las placas en la estufa, se procedió a la interpretación de los resultados. El resultado del análisis se valoró, con la existencia, o no, de una zona de inhibición del crecimiento de microorganismos alrededor del pocillo, mostrándose de este modo la sensibilidad de éstos a los diferentes antimicrobianos estudiados.

Para realizar las lecturas se colocaron las placas sobre un fondo negro y se enfocaron con una fuente luminosa. Se empleó un calibre digital de $\pm 0,1$ mm de precisión y se tomó la medida del diámetro de la zona de inhibición (incluido el pocillo de 14 mm) por duplicado, en aquellas partes más definidas de la circunferencia. Se consideró un aumento de 1 mm de la zona de inhibición (diámetro = 16 mm) como el mínimo necesario para poder cuantificar las medidas.

En la Figura 17, se presenta un esquema de la secuencia de preparación de las placas y la medida de las zonas de inhibición.

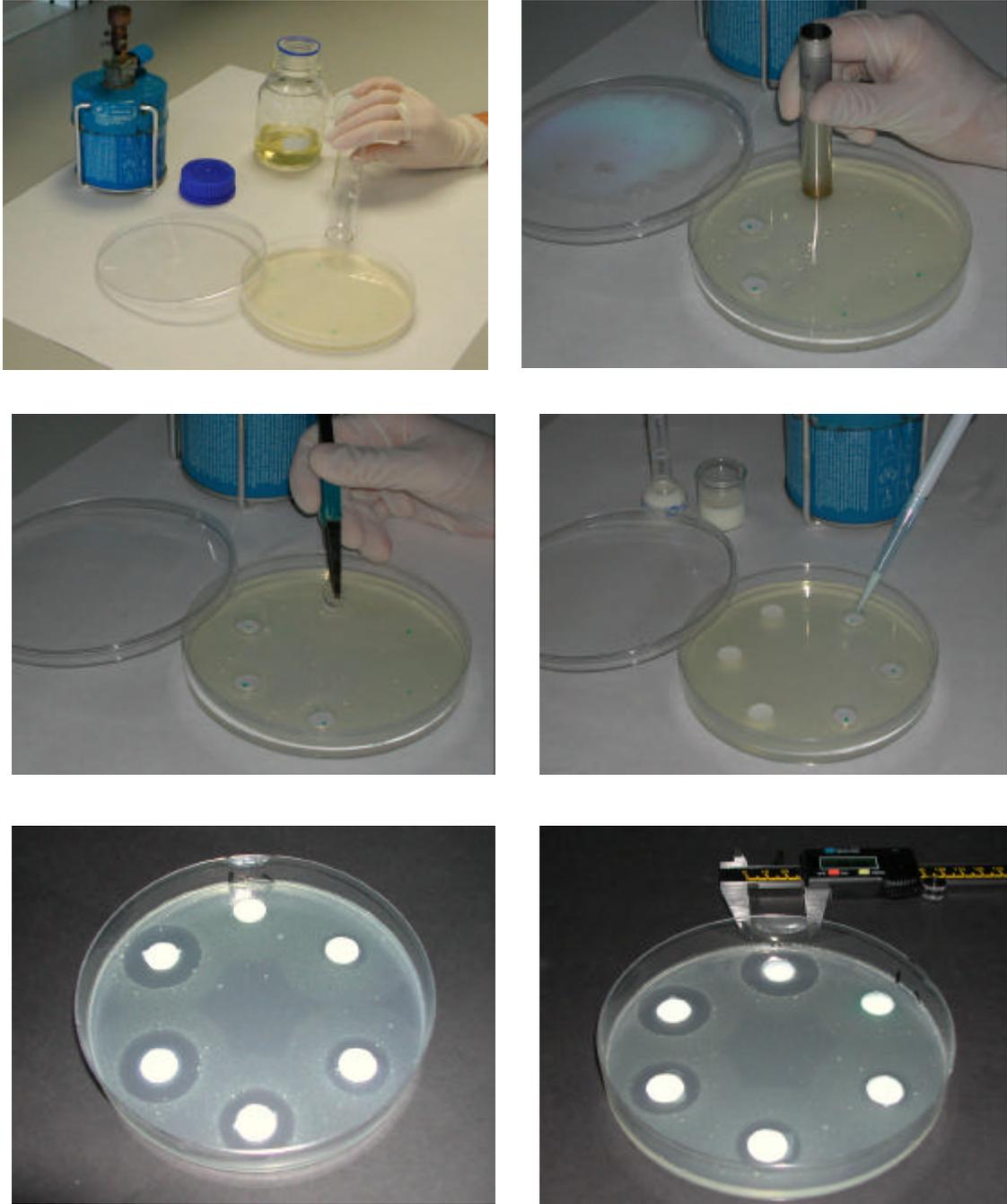


Figura 17 Secuencia de preparación de las placas y medida de los halos de inhibición.

2.4. MÉTODOS ESTADÍSTICOS

2.4.1. Efecto de la naturaleza de la leche

Este experimento se planteó para estudiar el comportamiento del SMMP para la detección de residuos de diferentes grupos de antimicrobianos en leche de oveja, comparando los resultados con los obtenidos en leche de vaca.

El modelo estadístico para el análisis de los factores que afectan al tamaño de la zona de inhibición.

$$Y_{ijk} = \mu + TL_i + EM_j + MH_k + \varepsilon_{ijkl}$$

Donde:

Y_{ijk} : variable dependiente (diámetro del halo de inhibición)

μ : media general

TL_i : efecto del tipo de leche ($i = 2$, leche de vaca o leche de oveja)

EM_j : efecto de la elaboración del medio de cultivo ($j = 2$)

MH_k : efecto de la medida del halo de inhibición, es decir, la repetición de la medida ($k = 2$)

ε_{ijkl} : error residual del modelo

Para la resolución del modelo propuesto anteriormente, se utilizó el ANOVA mediante el procedimiento GLM (General Linear Model) del paquete estadístico SAS[®] (SAS, 1998).

2.4.2. Linealidad y límites de detección

Los resultados de las medidas de los halos de inhibición obtenidos experimentalmente fueron introducidos en una hoja de cálculo Excel[®] (Excel, 1997) y posteriormente transformados para su análisis mediante el paquete estadístico (SAS, 1998).

En dicho análisis estadístico, se estudiaron los factores que afectan al diámetro del halo de inhibición utilizando el procedimiento General Lineal Model o GLM (SAS, 1998) mediante el siguiente modelo estadístico:

$$Y_{ijkl} = \mu + C_i + EM_j + MH_k + \varepsilon_{ijkl}$$

Siendo:

Y_{ijkl} : variable dependiente (diámetro del halo de inhibición).

μ : media general.

C_i : efecto de la concentración ($i=5$)

EM_j : efecto de la elaboración de la placa de cultivo ($j = 3$)

MH_k : efecto de la medición del halo de inhibición, es decir la repetición de la medición ($k = 2$).

ε_{ijkl} : error residual del modelo.

A fin de establecer una relación entre el diámetro de la zona de inhibición y la concentración de antibiótico presente en la leche de oveja, se aplicó el siguiente modelo de regresión lineal a las variables transformadas:

$$Y_{ij} = \beta_0 + \beta_1 \log C_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} : variable dependiente (diámetro del halo de inhibición medido en mm).

β_0 y β_1 : parámetros calculados por el modelo de regresión lineal simple.

$\log C_i$: variable independiente (logaritmo decimal de la concentración de antibiótico medido en $\mu\text{g /kg}$).

ε_{ij} : error residual del modelo.

A partir de esta ecuación, se calcularon las concentraciones que producen diámetros de la zona de inhibición de 18 mm, 20 mm y 22 mm en cada placa. Haciendo uso de estas concentraciones se establece el “diámetro o nivel de decisión”.

Este último análisis estadístico se realizó mediante el procedimiento REG del paquete estadístico SAS[®] (SAS, 1998).

2.4.3. Especificidad del Sistema Microbiológico Multiplaca “SMMP”

Para el cálculo de la selectividad de cada placa se determinó la frecuencia relativa porcentual de aquellas muestras que presentaron diámetros de halos superiores a 16 mm, del total de muestras analizadas.

En el experimento de la especificidad cruzada no se aplicó ningún análisis estadístico, ya que el estudio de la especificidad del sistema multiplaca se realizó para comprobar posibles interferencias entre las placas preparadas para la detección de un grupo, por ejemplo betalactámicos o tetraciclinas, con el resto de familias de antimicrobianos; por tanto los resultados obtenidos se clasificaron en positivos si había presencia de zona de inhibición o, por el contrario, negativos si no se presentaba.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. PRIMER ESTUDIO: EVALUACIÓN DEL METODO MICROBIOLÓGICO DE CRIBADO ECLIPSE® “100ov” EN LA LECHE DE OVEJA

1.1. SELECTIVIDAD DEL MÉTODO ECLIPSE® “100ov”

Las calificaciones visuales encontradas en el método Eclipse® “100ov” resultaron “negativas” y “dudosas”. En ningún caso se presentaron resultados que pudieran corresponder a la clasificación de “positivos” (“falsos positivos”). Hay que señalar, que de los análisis por duplicado de las 508 muestras de leche solamente en 41 casos (8,1%) presentaron la calificación de “dudosos”.

En el Cuadro 22 se muestran los valores de chi-cuadrado y los niveles de significación correspondientes a los efectos del “conservante”, estado de lactación y su interacción sobre las lecturas visuales del método Eclipse® “100ov”. Se observa un efecto significativo del conservante ($p < 0,001$), mientras que el efecto del estado de lactación no afectó en forma significativa a la respuesta del método. Sin embargo, su interacción con el conservante presentó un valor cercano a la significación ($p = 0,0573$) debido a los resultados encontrados en las muestras con azidiol donde el efecto del estado de lactación sí que resultó significativo ($\chi^2 = 41,95$; $p < 0,0001$).

Cuadro 22. Resultados de la aplicación de la regresión logística a las calificaciones visuales del método Eclipse® “100ov”

Efecto	Valor χ^2	Valor “p”
Conservante	38,57	0,0001
Lactación	0,52	0,4724
Conservante * Lactación	3,61	0,0573

Las frecuencias relativas determinadas en las muestras de leche de oveja sin conservante y con azidiol analizados con el método Eclipse® “100ov” se presentan en la Figura 18, donde se observa el incremento de resultados dudosos en las muestras que contienen el conservante. Esta interferencia del azidiol ya ha sido señalada anteriormente en la evaluación de otros métodos microbiológicos, utilizados en la detección de residuos en la leche de oveja, como son el BRT AiM® con predifusión y el Delvotest® (Molina *et al.*, 2003a).

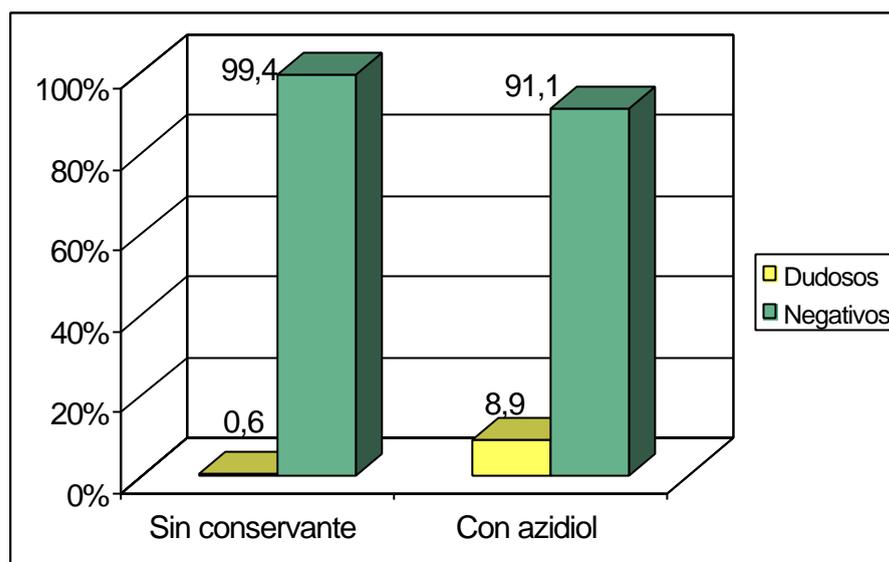


Figura 18. Efecto del conservante sobre las respuestas visuales del método Eclipse® “100ov” en muestras de leche de oveja (n=508)

En el Cuadro 23 se presentan las frecuencias absolutas y relativas (%) de los resultados obtenidos cuando el método Eclipse® “100ov” se utiliza con muestras de leche de oveja, sin conservante y con azidiol, a lo largo del período experimental.

Cuadro 23. Frecuencias absolutas y relativas (%) de los resultados del método Eclipse® “100ov” en la leche de oveja a lo largo de la lactación (n=508)

		Días de lactación						
		45 (n=80)	60 (n=80)	75 (n=73)	90 (n=69)	105 (n=69)	120 (n=68)	135 (n=68)
Sin conservante								
Dudosos	n	2	0	6	0	0	0	1
	(%)	2,5	0	0	0	0	0	1,5
Negativos	n	78	80	73	69	69	68	67
	(%)	97,5	100	100	100	100	100	98,5
Con azidiol								
Dudosos	n	9	9	6	0	0	3	18
	(%)	12,7	12,7	9	0	0	4,4	26,5
Negativos	n	71	71	67	69	69	65	50
	(%)	87,3	87,3	92	100	100	95,6	73,5

En las muestras de leche sin conservante, hay que destacar el bajo número de resultados “dudosos” detectados, con tan solo 2 y 1 muestras

correspondientes a los controles realizados a los 45 y 135 días después del parto (2,5 y 1,5%, respectivamente). Por el contrario, en las muestras con azidiol el número de resultados dudosos fue más elevado y, se observan en un mayor número de controles.

Así, en las frecuencias relativas de los resultados dudosos y negativos obtenidos en las muestras con azidiol se puede apreciar un mayor porcentaje de casos dudosos en los tres primeros controles realizados a los 45, 60 y 75 días posteriores al parto (12,7, 12,7 y 9% respectivamente) y también en el último control a los 135 días (26,5%), lo que parece indicar un efecto sinérgico de la composición de la leche, que varía a lo largo del ciclo productivo, y el conservante azidiol sobre el *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* presente en el método.

Althaus (1999) señala, en la evaluación del método microbiológico BRT AiM[®] con predifusión para la leche de oveja, el comentado incremento de casos dudosos al final de la lactación, que llega a alcanzar en dicho experimento un 33,5% a los 135 días de lactación.

Por otra parte, la selectividad (número de casos negativos/número de casos totales) para el método Eclipse[®] “100ov” durante todo el experimento resultó muy elevada. En el Cuadro 24 se presentan los valores de selectividad para el método Eclipse[®] “100ov” comparados con los obtenidos para los métodos Delvotest[®] y el BRT AiM[®] evaluados también en el caso de la leche de oveja por Molina *et al.* (2003a).

Cuadro 24. Selectividad del método Eclipse[®] “100ov” comparada con los métodos BRT AiM[®] y Delvotest[®]

	Eclipse [®]	BRT [®] *	Delvotest [®] *
Sin conservante	0,99	0,96	0,98
Con azidiol	0,91	0,90	0,91

* Molina *et al.* (2003a)

Hay que indicar que la selectividad del método Eclipse[®] “100ov” ha sido calculada a partir de resultados que solo presentaron valores “negativos” y “dudosos” mientras que la selectividad de los otros métodos de inhibición microbiológica (Cuadro 24) fue determinada con resultados “positivos”, “dudosos” y “negativos”.

El efecto de la adición de azidiol sobre los resultados de los métodos microbiológicos comentados se pone de manifiesto con una disminución de la selectividad debida al incremento de resultados “falsos positivos” y “dudosos”.

Diversos autores han estudiado y comparado los métodos de detección de inhibidores indicando las cantidades de “falsos positivos” que aparecen en cada método. Así, Carlsson y Björck (1987), Cullor (1992), Cullor *et al.* (1992,1994) y Tyler *et al.* (1992) señalaron en leche de vaca, que la exactitud de los métodos varía mucho cuando se utilizan en muestras procedentes de

animales individuales, donde se observa un aumento de resultados “falsos positivos”.

En un estudio realizado por Seymour *et al.* (1998) en muestras de leche de 122 vacas, utilizando los métodos Delvotest[®] y Penzym[®] en comparación con el método de referencia de discos, obtuvieron que el 17% de las muestras presentaban resultados “positivos” en ambos métodos y “negativos” en el ensayo de referencia (disk assay).

En un experimento realizado en la Universidad de Pensilvania por Sisco y Burns (1993), en el que se compararon diferentes métodos, se presenta una relación de selectividad del 0,95 para el Delvotest[®] SP usando como método de referencia el “Bs disk assay”.

A su vez, Romnee (1995), en un estudio comparativo entre los ensayos Delvotest[®], Valio[®] T-101 y Penzym[®], señala que la mejor concordancia encontrada (92,4%) fue entre el Delvotest[®] SP y Penzym[®] S cuando se analizan muestras de leche de vaca tratadas con antibióticos betalactámicos. Este porcentaje de coincidencia disminuye al 83,7% cuando existen otros antibióticos presentes en el tratamiento.

Por otra parte, hay que recordar que la evaluación de los ensayos microbiológicos para la detección de inhibidores se realiza en la mayoría de los casos mediante calificaciones visuales que, además de ser un método subjetivo, puede verse afectado por los diferentes mecanismos de acción de los agentes antimicrobianos. En efecto, dichas interpretaciones pueden depender de los mecanismos de acción de las sustancias (bactericidas o bacteriostáticos), provocando en ocasiones, diferentes intensidades en el color del indicador y por lo tanto, ocasionar dificultades en la posterior interpretación de los resultados.

Todo ello hace que resulte necesario utilizar criterios de interpretación de los resultados más objetivos y fiables como son la lectura de absorbancias mediante fotómetro, a las longitudes de onda adecuadas.

1. 2. LÍMITES DE DETECCIÓN DEL MÉTODO ECLIPSE[®] “100ov”

Según se comentó en el apartado de Material y Métodos, en el caso de los límites de detección, las respuestas del método Eclipse[®] “100ov” se evaluaron en forma visual (en términos de positivo o negativo) y de modo fotométrico, efectuando las lecturas a 590 y 650 nm. Por este motivo se presentan los resultados obtenidos para cada grupo de agentes antimicrobianos según el diferente tipo de lectura efectuada.

1. 2. 1. Detección de betalactámicos en leche de oveja

1. 2. 1. 1. Efecto de la concentración de betalactámicos sobre las lecturas visuales y fotométricas

Los principales parámetros estadísticos calculados mediante la aplicación del modelo de regresión logística sobre la frecuencia relativa de casos positivos y las absorbancias relativas porcentuales se resumen en el Cuadro 25. En este cuadro, se muestran los valores de la ordenada en el origen (β_0), pendiente (β_1) y coeficiente de concordancia (C).

Se aprecia en dicho cuadro los elevados valores de los coeficientes β_1 que presentan la penicilina “G” y amoxicilina en comparación con el resto de antibióticos betalactámicos, tanto para las calificaciones visuales como para las lecturas fotométricas. Los elevados valores de los coeficientes β_1 indican la gran sensibilidad del *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* para detectar antibióticos betalactámicos en leche de oveja.

Otros autores, también han observado este hecho al calcular los límites de detección de los métodos microbiológicos BRT AiM[®] (Althaus *et al.* 2001; Molina *et al.*, 2003b) y Delvotest[®] (Althaus *et al.*, 2002, 2003b).

Cuadro 25. Resultados del modelo de regresión logística aplicado a la detección de betalactámicos en leche de oveja con el método Eclipse[®] “100ov”

Betalactámicos	Visuales			Fotométricas		
	β_0	β_1	C	β_0	β_1	C
Penicilina “G”	-19,745	4,594	98,7	-7,512	1,700	94,7
Amoxicilina	-27,257	4,335	99,8	-4,556	0,830	95,7
Cloxacilina	-34,065	0,546	98,9	-9,260	0,133	97,0
Oxacilina	-24,737	0,988	99,7	-6,809	0,261	96,9
Cefadroxil	-37,377	0,471	98,2	-10,523	0,133	96,7
Cefalexina	-17,362	0,177	97,9	-8,322	0,080	96,2
Cefoperazone	-16,610	0,183	98,3	-6,566	0,074	94,9
Cefuroxime	-12,921	0,187	98,2	-4,978	0,080	93,9

Los elevados valores de los coeficientes de concordancia (C), que se sitúan para el caso de las lecturas visuales entre 97,9-99,8% y en las fotométricas entre 94,9-97,0%, ponen de manifiesto el adecuado ajuste alcanzado mediante la aplicación del modelo logístico.

En la Figura 19 se representan las frecuencias relativas de calificaciones positivas obtenidas para las diferentes concentraciones de penicilinas en la leche de oveja, así como también las curvas sigmoideas construidas mediante la aplicación del modelo de regresión logístico aplicado a las calificaciones visuales. De igual forma, en la Figura 20 se muestra el efecto de la concentración de penicilinas sobre las absorbancias relativas del método Eclipse® “100ov”.

En ambas figuras se puede apreciar el rápido cambio en la respuesta que experimenta el método Eclipse® “100ov” ante pequeñas concentraciones de penicilina y amoxicilina, ya que ambos antimicrobianos poseen mayores valores de coeficientes β_1 (Cuadro 25) que la oxacilina y cloxacilina.

Otros antibióticos, en cambio, requieren incrementos mayores en su concentración para producir respuestas positivas, así por ejemplo, la cloxacilina necesita un incremento de aproximadamente 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para obtener el 100% de casos positivos al método.

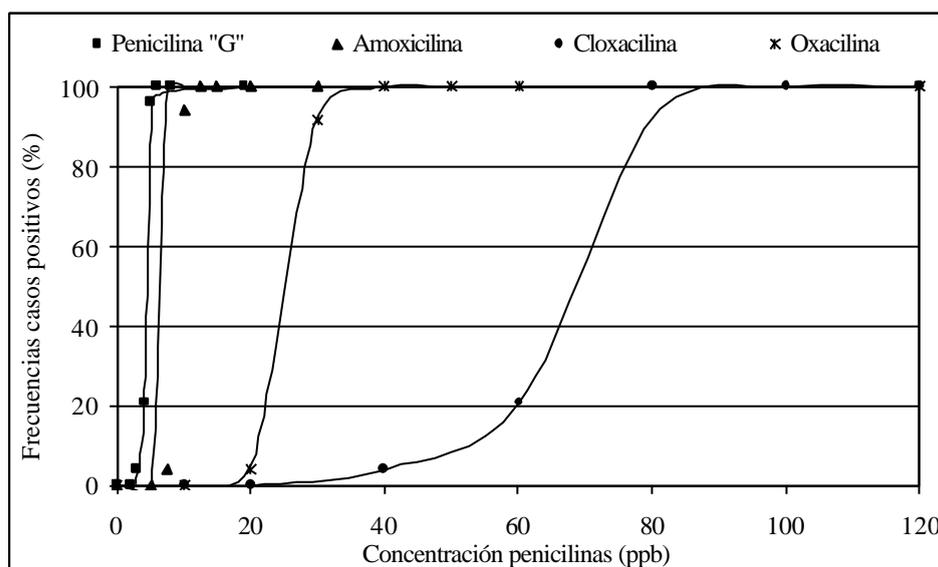


Figura 19. Efecto de la concentración de penicilinas sobre la frecuencia de casos positivos del método Eclipse® “100ov”

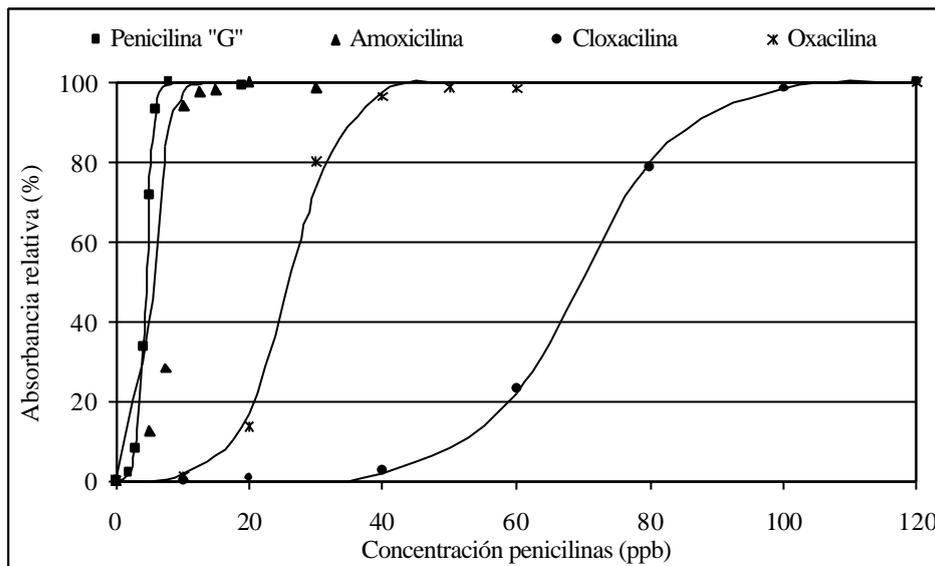


Figura 20. Efecto de la concentración de penicilinas sobre la absorbancia relativa del método Eclipse® "100ov"

El efecto de las concentraciones de cefalosporinas sobre las frecuencias de resultados positivos y las absorbancias porcentuales del método Eclipse® "100ov" se muestra en la Figura 21 y la Figura 22, respectivamente.

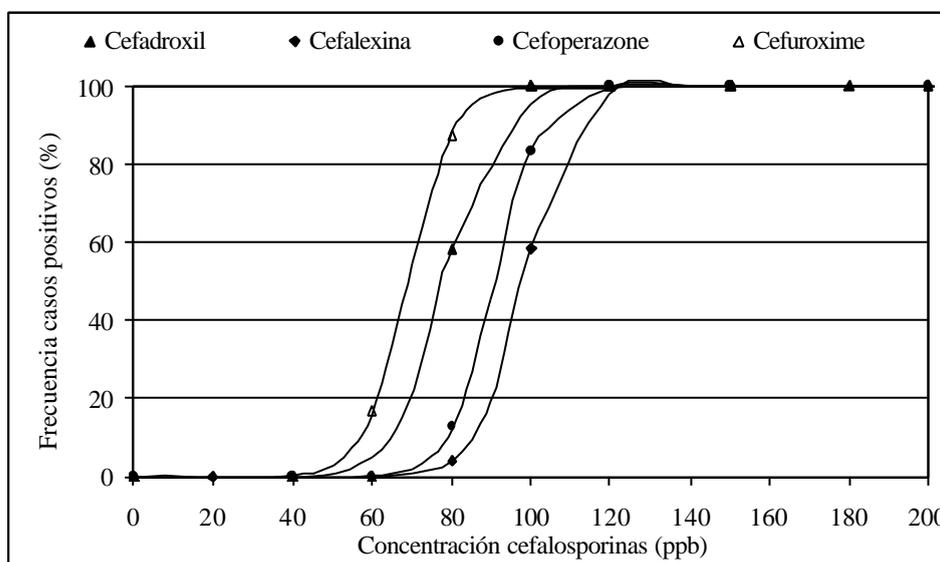


Figura 21. Efecto de la concentración de cefalosporinas sobre la frecuencia de casos positivos del método Eclipse® "100ov"

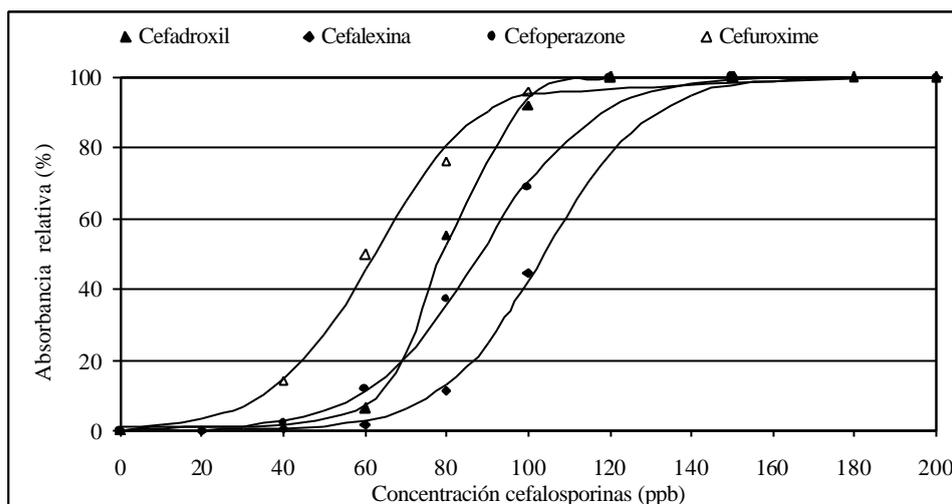


Figura 22. Efecto de la concentración de cefalosporinas sobre la absorbancia relativa del método Eclipse® “100ov”

Al igual que en el caso anterior se puede observar que cefalexina, y cefoperazone y cefuroxime, por presentar menores valores de sus coeficientes β_1 (Cuadro 25) requerirán mayores incrementos en sus concentraciones para obtener el 100% de resultados positivos.

1. 2. 1. 2. Límites de detección de betalactámicos

Los límites de detección de los antibióticos betalactámicos calculados mediante los coeficientes del modelo de regresión logística (Cuadro 25) para las calificaciones visuales y fotométricas del método Eclipse® “100ov” se muestran en el Cuadro 26. También se pueden observar los valores de los Límites Máximos de Residuos (LMRs) establecidos por la Unión Europea para este grupo de antibióticos.

Comparando los límites de detección calculados mediante las calificaciones visuales con los determinados por medio de las absorbancias relativas se puede apreciar que los valores resultaron muy cercanos para las penicilinas (penicilina, amoxicilina, cloxacilina y oxacilina), mientras que los límites obtenidos a partir de las calificaciones visuales para las cefalosporinas (cefalexina, cefadroxil, cefoperazone y cefuroxime) fueron ligeramente superiores a los calculados haciendo uso del lector óptico. Este hecho también fue observado por Althaus *et al.* (2001) al utilizar el método BRT AiM® con leche de oveja, calculando límites de detección superiores para antibióticos betalactámicos al efectuar interpretaciones visuales que los obtenidos mediante las medidas fotométricas.

Cuadro 26. Límites de detección de betalactámicos en leche de oveja para el método Eclipse® "100ov"

Betalactámicos	Límites de detección (µg/kg)		LMRs-UE	
	Visuales	Fotométricas	µg/kg	Especie
Penicilina "G"	5	4	4	Todas
Amoxicilina	7	5	4	Todas
Cloxacilina	68	67	30	Todas
Oxacilina	28	25	30	Todas
Cefadroxil	86	77	---	---
Cefalexina	115	101	100	Vaca
Cefoperazone	110	86	50	Vaca
Cefuroxime	85	60	---	---

En la bibliografía consultada no se encontraron valores de límites de detección para el Eclipse® "100ov", por tratarse de un método de cribado (screening) relativamente nuevo. Sin embargo, se conoce la respuesta de otros métodos de cribado que utilizan *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* como sensor microbiológico.

Así, los valores presentados en el Cuadro 26 para la penicilina "G", amoxicilina, cloxacilina, cefoperazone y cefuroxime resultaron similares a los indicados por Althaus *et al.* (2001) cuando utiliza el método BRT® con leche de oveja y lecturas fotométricas (2 µg/kg; 4 µg/kg; 26 µg/kg; 51 µg/kg y 51 µg/kg, respectivamente). Sin embargo, Althaus *et al.* (2003b) señalan niveles más bajos cuando estudian también mediante absorbancias el método Delvotest® "SP" con muestras de leche de oveja (1 µg/kg; 3 µg/kg; 18 µg/kg; 20 µg/kg y 20 µg/kg, respectivamente).

Los límites de detección calculados para la penicilina "G" utilizando el método Eclipse® "100ov" (Cuadro 26) son superiores a los 1,5 µg/kg (Heeschen y Blüthgen, 1995) 1-2 µg/kg (Frank, 1995), 2-3 µg/kg (Zaadhof *et al.*, 1997) y 2-3 µg/kg (Analytic in Milch, 1998b) calculados para diferentes versiones del Brilliant reduction Test (BRT) con muestras de leche de vaca. Por el contrario, los límites obtenidos para la penicilina "G" en leche de oveja (Cuadro 26) resultaron inferiores a los señalados por otros autores (Jaskch, 1988; Charm y Ruth, 1993; Heeschen, 1993) que se encuentran comprendidos entre 6 y 10 µg/kg.

También en leche de vaca, Frank (1995) al igual que la casa fabricante del método BRT AiM® (Analytic in Milch, 1998a) establecen un rango para el límite de detección de la amoxicilina comprendido entre 2 y 3 µg/kg, inferior al

determinado para el método Eclipse[®] "100ov"; sin embargo, Charm y Ruth (1993) obtienen un límite de detección de 5 µg/kg.

Para la cloxacilina, Jaskch (1988), Heeschen (1993), Heeschen y Blüthgen (1995) indican valores similares a los presentados en el Cuadro 26 cuando utilizan diferentes versiones del Brilliant Black Reduction Test (BR-Test) con leche de vaca, aunque Charm y Ruth (1993) establecieron un límite de 100 µg/kg, valor superior al determinado en este trabajo mediante el método Eclipse[®] "100ov".

Cuando el método Delvotest[®] se utiliza para detectar residuos de amoxicilina en leche de vaca, Honkanen-Buzalski y Reybroeck (1997) y Shuren y Reichmuth (1998) señalan un límite de detección de 6 µg/kg, similar al calculado en el presente trabajo. Sin embargo, para residuos de cloxacilina. Van Os y Beukers (1980) y Gardner *et al.* (1996) presentan un valor de 30 µg/kg cuando emplean este método con leche de vaca.

Jaskch (1988), al utilizar otras versiones del método BRT también con leche de vaca obtiene para el cefoperazone un límite de detección de 80 µg/kg, similar a las 86 µg/kg determinado fotométricamente para el método Elipse[®] "100ov" (Cuadro 26).

Cuando se comparan los valores de los límites de detección de los antibióticos betalactámicos encontrados en el caso de la leche de oveja mediante el método Eclipse[®] "100ov" con los valores de los LMR establecidos por la UE (Cuadro 26), se observa que este método permite detectar residuos de penicilina "G", amoxicilina, oxacilina y cefalexina a niveles similares a los LMRs-UE, sin embargo los residuos de cloxacilina y cefoperazone deben ser superiores al LMR para poder ser detectados por este método microbiológico. De las otras dos cefalosporinas estudiadas (cefadroxil y cefuroxime) no se puede realizar la comparación al no existir LMR legislado.

1. 2. 2. Detección de aminoglucósidos en leche de oveja

1. 2. 2. 1. Efecto de la concentración de aminoglucósidos sobre las lecturas visuales y fotométricas

En el Cuadro 27 se exponen los valores de los coeficientes β_0 , β_1 y porcentaje de concordancia (C) obtenidos mediante la aplicación del modelo de regresión logística, para el caso de los aminoglucósidos.

Los bajos valores de los coeficientes β_1 que presentan los aminoglucósidos en comparación con los antibióticos betalactámicos, indican la necesidad de realizar grandes cambios en sus concentraciones para poder obtener variaciones en las respuestas del método. El coeficiente de concordancia por su parte, presentó valores elevados al estar comprendidos entre 81,1-92,7% para las lecturas fotométricas y 91,8-98,0% para las visuales, revelando un adecuado ajuste logrado mediante la modelización utilizada.

Cuadro 27. Resultados del modelo de regresión logística aplicado a la detección de aminoglucósidos en leche de oveja con el método Eclipse® “100ov”

Aminoglucósidos	Visuales			Fotométricas		
	β_0	β_1	C	β_0	β_1	C
Gentamicina	-7,124	0,003	94,0	-3,244	0,002	84,8
Kanamicina	-11,917	0,001	98,0	-3,634	0,001	90,9
Neomicina	-4,945	0,001	91,8	-2,521	0,001	81,1
Estreptomina	-11,143	0,001	97,3	-5,174	0,001	92,7

En la Figura 23 se presentan las variaciones en los porcentajes de las respuestas positivas del método Eclipse® “100ov” para los cuatro aminoglucósidos ensayados, así como las curvas obtenidas mediante la aplicación del modelo de regresión logístico, mientras que en la Figura 24 se representa el efecto de las concentraciones de aminoglucósidos sobre las absorbancias porcentuales de este método microbiológico.

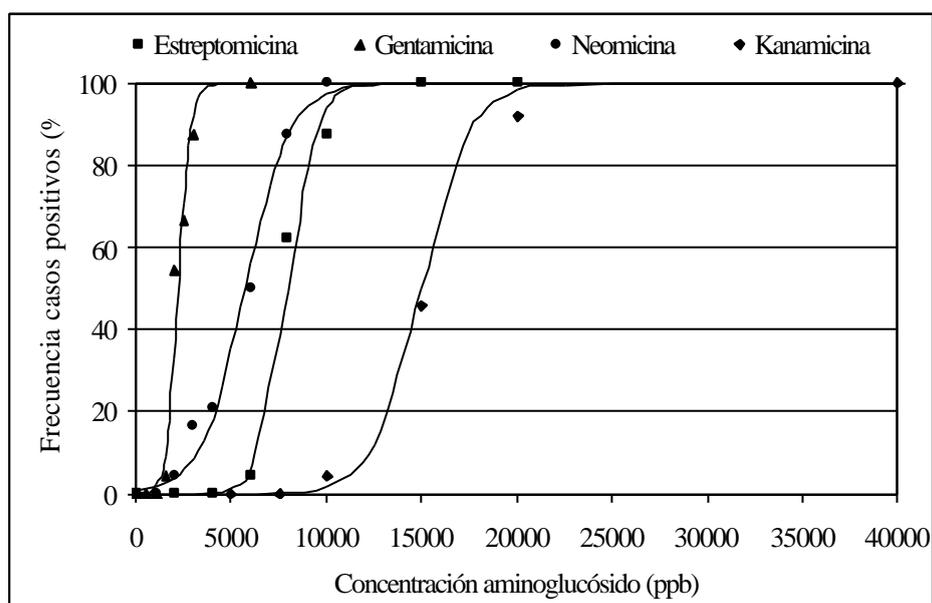


Figura 23. Efecto de la concentración de aminoglucósidos sobre la frecuencia de casos positivos del método Eclipse® “100ov”

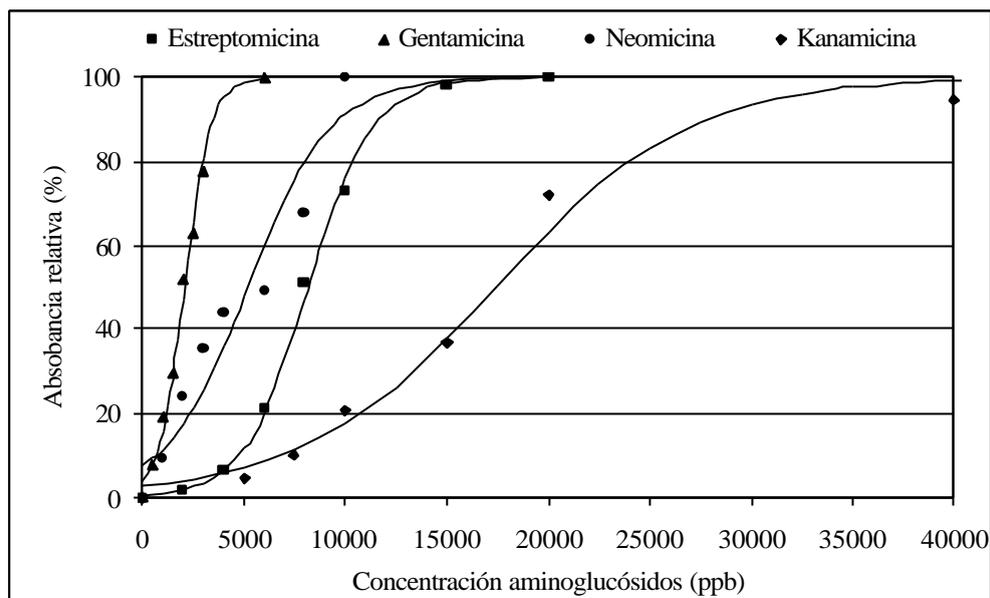


Figura 24. Efecto de la concentración de aminoglucósidos sobre la absorbancia relativa del método Eclipse® “100ov”

Se puede observar que la kanamicina, por presentar menor valor del coeficiente β_1 que el resto de los aminoglucósidos, requiere de mayores incrementos en su concentración para producir un cambio en la respuesta del método (Figura 23 y Figura 24).

1. 2. 2. 2. Límites de detección de aminoglucósidos

Los límites de detección calculados como la concentración que produce el 95% de resultados positivos (lecturas visuales) o el 45% de la máxima absorbancia relativa (lecturas fotométricas) junto a los LMRs-UE se exponen en el Cuadro 28.

Cuadro 28. Límites de detección de aminoglucósidos en leche de oveja para el método Eclipse® “100ov”

Aminoglucósidos	Límites de detección ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		LMRs-UE	
	Visuales	Fotométricas	$\mu\text{g}/\text{kg}$	Especie
Gentamicina	3140	1950	100	Vaca
Kanamicina	18700	16400	150	Vaca
Neomicina	9100	4800	1500	Todas
Estreptomicina	10100	6800	200	Vaca-Oveja

Se puede observar en dicho cuadro que los límites de detección calculados mediante las calificaciones visuales resultaron superiores a los determinados a partir de las lecturas fotométricas.

Si se comparan los límites de detección obtenidos para la gentamicina, kanamicina, neomicina, y estreptomina en leche de oveja con los LMR establecidos por la UE en leche de vaca, se evidencia que el método Eclipse® “100ov” no puede detectar dichas concentraciones. Este hecho responde a la falta de sensibilidad del *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* para estos agentes antimicrobianos.

Esta baja sensibilidad del *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* para detectar aminoglucósidos en leche de oveja también ha sido señalada por otros autores en diferentes métodos microbiológicos de cribado. Así Molina *et al.* (2003b) para el método BRT AiM® calcula límites , de un modo fotométrico, correspondiente a 1200 µg/kg, 3700 µg/kg y 6000 µg/kg para la gentamicina, neomicina y estreptomina respectivamente. En el caso del Delvotest® (Althaus *et al.*, 2003b), obtuvieron límites 1200 µg/kg, 2600 µg/kg y 6100µg/kg para los mismos aminoglucósidos.

Hay que destacar que otros autores al utilizar diferentes tipos del BRT con leche de vaca, señalan límites de detección inferiores a los calculados en el Cuadro 28, así por ejemplo, Frank (1995) observa rangos para los residuos de estreptomina y gentamicina de 1500-5000 µg/kg y 400-1000 µg/kg, respectivamente. De igual forma, Charm y Ruth (1993) detectan niveles más bajos de neomicina (500 µg/kg) cuando emplean el citado método.

Al utilizar el método microbiológico Delvotest® con leche de vaca, Senyk *et al.* (1990) obtienen valores levemente inferiores para la estreptomina (6000 µg/kg) y gentamicina (1200 µg/kg) que los calculados en este trabajo para ambos aminoglucósidos. También, Van Os y Beukers (1980) señalan para el método Delvotest® un rango de detección para residuos de neomicina (1000-2000 µg/kg) en leche de vaca inferior al determinado con el método Eclipse® “100ov” en el presente estudio.

Dada la baja sensibilidad del microorganismo utilizado en todos los metodos anteriormente comentados, resulta interesante destacar los estudios realizados por Aureli *et al.* (1996) al investigar la sensibilidad del *Bacillus subtilis* ATCC 6633 a la estreptomina, ya que este microorganismo es capaz de detectar 125 µg/kg y aún obtienen una mayor sensibilidad (10 µg/kg) cuando incorporan cisteína al medio de cultivo, ambas concentraciones resultan inferiores a los 200 µg/kg establecidas por la UE como LMR.

También, Nouws *et al.* (1999a,b) logran detectar en leche de vaca 200 µg/kg de estreptomina o neomicina, 300 µg/kg de kanamicina y 50 µg/kg de gentamicina cuando utilizan *Bacillus subtilis* BGA a pH 8,0.

Los métodos de receptor microbiológico presentan, por su parte, una mayor sensibilidad a los antibióticos aminoglucósidos que los métodos de inhibición microbiológica. Así por ejemplo, el método Charm® II que utiliza como sensor el *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* en forma de receptor

microbiológico posee un límite de detección de 20 µg/kg para la estreptomicina (Charm y Ruth, 1993), valor inferior al LMR-UE.

1. 2. 3. Detección de macrólidos en leche de oveja

1. 2. 3. 1. Efecto de la concentración de macrólidos sobre las lecturas visuales y fotométricas

Los resultados de la aplicación del modelo de regresión logística a los cambios en las frecuencias relativas y absorbancias porcentuales, para las diferentes concentraciones de macrólidos se resumen en el Cuadro 29. Se puede apreciar el adecuado grado de ajuste alcanzado mediante el modelo logístico, con coeficientes de concordancia elevados, comprendidos en el intervalo de 97,3-99,7% para las lecturas visuales y 87,6-92,4% para fotométricas.

A fin de visualizar los cambios que se producen en los resultados a medida que se incrementa la concentración, se han elaborado las Figuras 25 y 26, donde se exponen también las curvas sigmoideas obtenidas a partir de los parámetros del Cuadro 29. La espiramicina no se ha considerado en la grafica por presentar un rango de concentración superior al utilizado en el eje de las abscisas, para el resto de antibióticos en este grupo.

Cuadro 29. Resultados del modelo de regresión logística aplicado a la detección de macrólidos en leche de oveja con el método Eclipse® “100ov”

Macrólidos	Visuales			Fotométricas		
	β_0	β_1	C	β_0	β_1	C
Eritromicina	-41,668	0,060	99,7	-4,850	0,007	87,6
Espiramicina	-14,845	0,001	97,3	-4,220	0,001	86,3
Tilosina	-15,581	0,081	98,1	-5,281	0,023	92,4

La eritromicina, por presentar menor valor del coeficiente β_1 que la tilosina, necesita mayor incremento en su concentración para obtener el 100% de casos positivos (Figura 25) y el 100% de la absorbancia relativa (Figura 26).

En dichas figuras se evidencia la mayor sensibilidad que presenta el método para detectar residuos de tilosina en leche de oveja en comparación con los residuos de eritromicina, ya que se necesita menores incrementos de concentración (150 µg/kg para lecturas visuales y 350 µg/kg para fotométricas) para obtener un 100% de casos positivos o absorbancias relativas, en comparación con la eritromicina (400 µg/kg para las interpretaciones visuales y 1400 µg/kg para fotométricas).

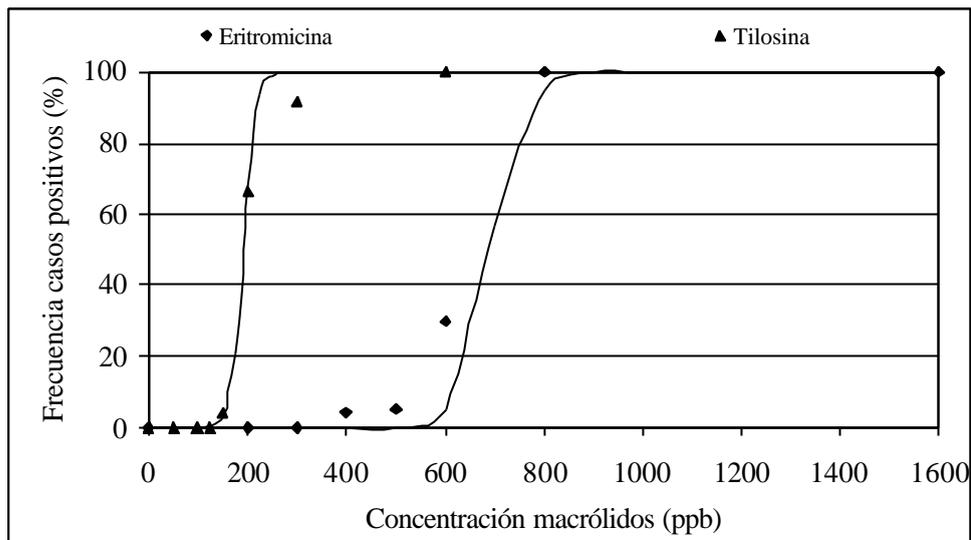


Figura 25. Efecto de la concentración de macrólidos sobre la frecuencia de casos positivos del método Eclipse[®] “100ov”

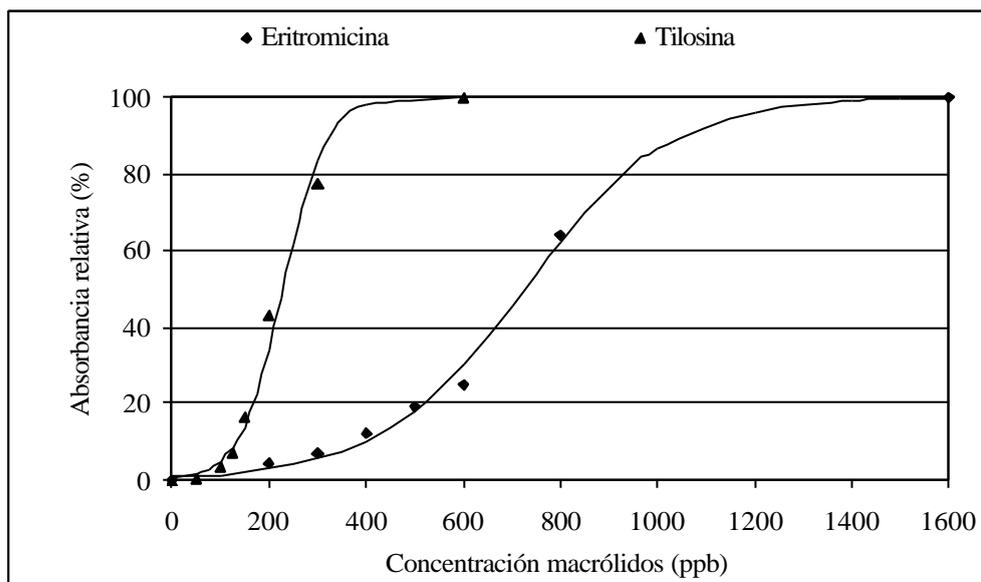


Figura 26. Efecto de la concentración de macrólidos sobre la absorbancia relativa del método Eclipse[®] “100ov”

1. 2. 3. 2. Límites de detección de macrólidos

Los límites de detección de los antibióticos del grupo de los macrólidos se presentan en el Cuadro 30 junto a los LMRs establecidos por la legislación europea.

Cuadro 30. Límites de detección de macrólidos en leche de oveja para el método Eclipse® “100ov”

Macrólidos	Límites de detección (µg/kg)		LMRs-UE	
	Visuales	Fotométricas	µg/kg	Especie
Eritromicina	750	700	40	Todas
Espiramicina	18100	15500	200	Vaca
Tilosina	230	220	50	Todas

Cuando se efectúa la comparación de los límites obtenidos para las calificaciones visuales con las fotométricas se observa, al igual que se presentó en las cefalosporinas y aminoglucósidos, que los límites determinados a partir de las calificaciones visuales resultaron ligeramente superiores a los calculados mediante las lecturas fotométricas, lo cual se puede atribuir a la diferencia de criterios que existe para su determinación, según se trabaje con calificaciones visuales (95% de la frecuencia relativa de casos positivos) o lecturas fotométricas (45% de la máxima absorbancia relativa porcentual).

Según se deduce del Cuadro 30, el *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* posee una mejor sensibilidad para detectar residuos de tilosina en leche de oveja (230 µg/kg y 220 µg/kg para visuales y fotométricas respectivamente) que en el resto de los macrólidos. Este hecho fue señalado por Molina *et al.* (2003b) para el método BRT AiM® y Althaus *et al.* (2003b) para el método Delvotest® que indican para ambos métodos en leche de oveja valores de 120 µg/kg para las lecturas visuales y de 100 µg/kg para las fotométricas. Sin embargo, Charm y Ruth (1993) llegan a detectar 50 µg/kg de tilosina en leche de vaca para otras versiones del BRT.

Con respecto a la eritromicina, el método Eclipse® “100ov” puede detectar valores entre 750 µg/kg cuando se utilizan criterios visuales ó 700 µg/kg al emplear lecturas fotométricas (Cuadro 30). Estos valores resultan similares a los señalados por Molina *et al.* (2003b) con el método BRT AiM®, (630 µg/kg) pero en el caso de la detección de eritromicina en leche de oveja con el método Delvotest® “SP” el límite encontrado (Althaus *et al.*, 2003b) resultó superior (830 µg/kg). También, Charm y Ruth (1993) obtienen un límite más elevado cuando emplean otras versiones del método BRT (1000 µg/kg) con muestras de leche de vaca.

Van Os y Beukers (1980) establecen para residuos de eritromicina en leche de vaca un rango de 400–900 µg/kg, similar a los límites calculados por los dos métodos de lectura (Cuadro 30) con el método Eclipse® “100ov”. No obstante, Charm y Ruth (1993) detectaron 100 µg/kg de residuos de tilosina en leche de vaca, valor inferior a los determinados mediante el método Eclipse® “100ov” en leche de oveja (Cuadro 30).

Comparando los límites determinados en leche de oveja mediante Eclipse[®] “100ov” (Cuadro 30) con las 40 µg/kg (eritromicina), 200 µg/kg (espiramicina) y 50 µg/kg (tilosina) establecidas como LMR por la UE para la leche, resulta evidente que este método no puede detectar las concentraciones exigidas para estos macrólidos, lo cual indica su baja sensibilidad hacia estos agentes antimicrobianos, especialmente la espiramicina, ya que requiere de concentraciones elevadas para inhibir el crecimiento del microorganismo de prueba. Este hecho también fue comentado en leche de oveja analizada mediante otros métodos microbiológicos de cribado (Althaus *et al.*, 2002, 2003b; Molina *et al.*, 2003b).

En este sentido, resulta conveniente destacar los estudios de Honkanen-Buzalki *et al.* (1997) a fin de evaluar la sensibilidad del *Streptococcus salivarius* var. *thermophilus* a la eritromicina presente en muestras de leche de vaca, al señalar un límite de detección de 75 µg/kg para este macrólido, valor mucho más próximo a las 40 µg/kg establecidas como LMR por la UE.

Sanofi Bio Industries (1996), por su parte, al estudiar la sensibilidad del *Streptococcus thermophilus* presente en el Test Valio[®]T-101, estableció un límite de detección de 50 µg/kg de eritromicina en muestras de leche de vaca.

Los estudios de límites de detección en leche de vaca del método de receptor microbiológico Charm[®] II (Charm y Ruth, 1993), indican concentraciones de 15 µg/kg para la eritromicina y 30 µg/kg para la tilosina, valores inferiores a los LMR fijados por la UE para estos macrólidos.

Nouws *et al.* (1999a,b) al utilizar *Micrococcus luteus* ATCC 9341 dentro de un bioensayo multiresiduo, son capaces de establecer criterios de detección de 30 µg/kg de eritromicina, 150 µg/kg de espiramicina y 500 µg/kg de tilosina en leche de vaca. Este hecho pone de manifiesto la buena sensibilidad de *M. luteus* para detectar residuos de eritromicina y espiramicina en comparación con *B. stearothermophilus* aunque este último presenta una mayor sensibilidad para la tilosina.

1. 2. 4. Detección de quinolonas en leche de oveja

1. 2. 4. 1. Efecto de la concentración de quinolonas sobre las lecturas visuales y fotométricas

Los valores de los coeficientes β_0 , β_1 y porcentaje de concordancia (C) obtenidos se muestran en el Cuadro 31.

Cuadro 31. Resultados del modelo de regresión logística aplicado a la detección de quinolonas en leche de oveja con el método Eclipse® “100ov”

Quinolonas	Visuales			Fotométricas		
	β_0	β_1	C	β_0	β_1	C
Ciprofloxacina	-9,272	0,002	97,1	-5,325	0,001	91,0
Enrofloxacin	-19,094	0,006	99,2	-4,686	0,001	91,7
Flumequina	-31,350	0,001	99,4	-2,269	0,001	81,8
Norfloxacin	-49,641	0,006	99,6	-6,387	0,001	91,9

Haciendo uso de estos coeficientes, se han elaborado la Figura 27 y la Figura 28. En ellas no se representa la flumequina por presentar un rango de concentraciones superiores al utilizado en las gráficas.

Se observa en ambas figuras que la norfloxacina debe estar presente en concentraciones muy elevadas, comprendidas entre 8000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 14000 $\mu\text{g}/\text{kg}$, para que sea detectada por el microorganismo del método Eclipse, lo que evidencia la falta de idoneidad para la detección de quinolonas del Eclipse® “100ov”.

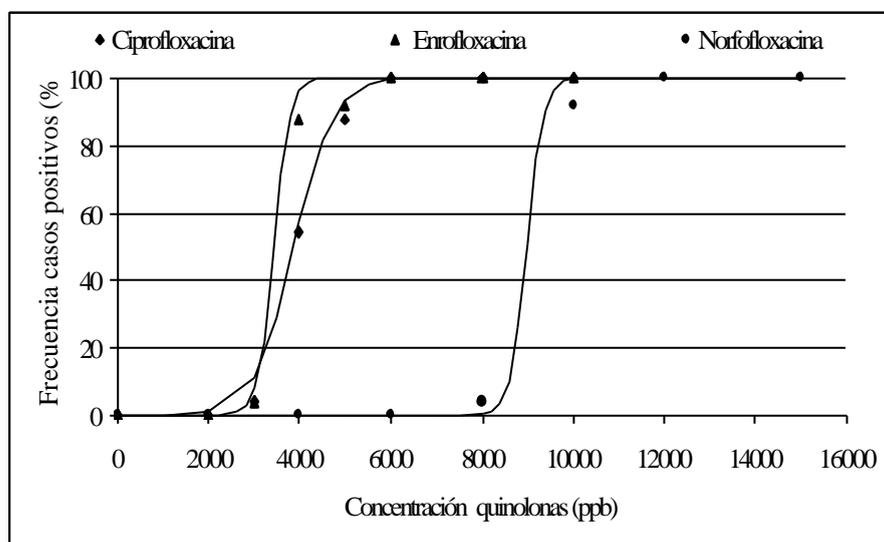


Figura 27. Efecto de la concentración de quinolonas sobre la frecuencia de casos positivos del método Eclipse® “100ov”

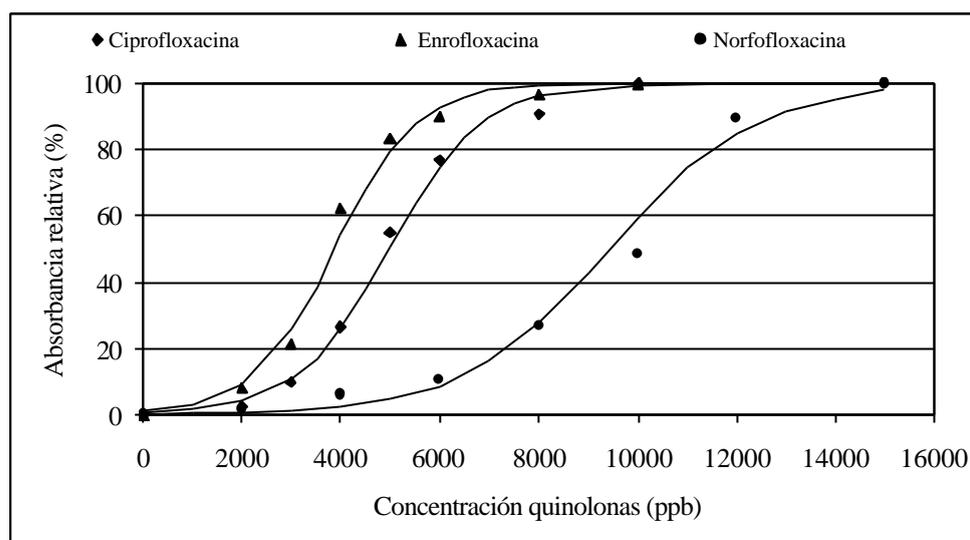


Figura 28. Efecto de la concentración de quinolonas sobre la absorbancia relativa del método Eclipse® "100ov"

1. 2. 4. 2. Límites de detección de quinolonas

El Cuadro 32 resume los límites de detección calculados con los parámetros del modelo de regresión logística del Cuadro 31, tanto para las calificaciones visuales como las fotométricas.

Cuadro 32. Límites de detección de quinolonas en leche de oveja para el método Eclipse® "100ov"

Quinolonas	Límites de detección ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		LMRs-UE	
	Visuales	Fotométricas	$\mu\text{g}/\text{kg}$	Especie
Ciprofloxacina	5100	4800	100	Vaca
Enrofloxacina	4000	3700	100	Vaca
Flumequina	76200	90000	50	Todas
Norfloxacina	9500	9100	---	---

Dado que no se han encontrado en la bibliografía consultada valores de límites de detección de quinolonas en leche de oveja para los diferentes métodos de inhibición microbiológica que utilizan el *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*, resulta imposible la comparación con otros trabajos realizados en esta especie.

Sin embargo, Müller y Jones (1993) señalan un valor elevado para la detección de residuos de enrofloxacina en leche de vaca detectados por diferentes versiones del método BRT que se hallan comprendidos entre 1000 y 2250 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Por ello, y debido a la baja sensibilidad que presenta el *Bacillus stearothermophilus* para la detección de quinolonas, Nouws *et al.* (1999a,b) recomiendan el uso de *Escherichia coli* ATCC 11303, que permite detectar en leche de vaca 5 µg/kg de enrofloxacin, 175 µg/kg de flumequina y 8 µg/kg de marfloxacin.

De las cuatro quinolonas estudiadas, la Unión Europea ha fijado el Límite Máximo de Residuos para enrofloxacin (100 µg/kg), su metabolito ciprofloxacina (100 µg/kg) y flumequina (50 µg/kg). Estos niveles son muy inferiores a los límites de detección del método Eclipse® “100ov” mostrados en el Cuadro 32.

1. 2. 5. Detección de tetraciclinas en leche de oveja

1. 2. 5. 1. Efecto de la concentración de tetraciclinas sobre las lecturas visuales y fotométricas

Los principales descriptores estadísticos que representan la variación de las calificaciones visuales y las absorbancias relativas del método Eclipse® “100ov” para diferentes concentraciones de tetraciclinas en la leche de oveja se detallan en el Cuadro 33.

Cuadro 33. Resultados del modelo de regresión logística aplicado a la detección de tetraciclinas en leche de oveja con el método Eclipse® “100ov”

Tetraciclinas	Visuales			Fotométricas		
	β_0	β_1	C	β_0	β_1	C
Clortetraciclina	-36,495	0,026	99,5	-2,864	0,002	86,1
Doxiciclina	-23,537	0,102	99,0	-4,279	0,018	91,1
Oxitetraciclina	-25,134	0,050	99,8	-3,478	0,006	92,1
Tetraciclina	-43,351	0,096	99,7	-3,342	0,007	88,9

Al comparar los coeficientes β_1 de las tetraciclinas (Cuadro 33) con los calculados para los antibióticos betalactámicos (Cuadro 25) se evidencia que el método Eclipse® “100ov” posee escasa sensibilidad para la detección de residuos de tetraciclinas en leche de oveja, al necesitarse mayores incrementos de concentraciones de tetraciclinas que de betalactámicos para producir el cambio de la respuesta del indicador púrpura de bromocresol. Este hecho se presenta tanto en las calificaciones visuales como en las lecturas fotométricas.

Los porcentajes de concordancia, al igual que se observó en los casos anteriores, resultaron elevados (comprendidos entre 86,1-92,1% para las lecturas fotométricas y 99,0-99,8% para las calificaciones visuales), indicando el buen ajuste logrado mediante el modelo logístico utilizado.

Los coeficientes β_1 fueron más elevados cuando se realizan lecturas visuales que los correspondientes a las medidas fotométricas, debido a la

mayor sensibilidad que posee el lector óptico al poder detectar pequeños cambios en la coloración del indicador presente en el medio.

Por otra parte, en la Figura 29 y la Figura 30 se visualiza el efecto de las concentraciones de tetraciclinas sobre las frecuencias de casos positivos y absorbancias porcentuales del método.

En la Figura 30 se observa que se necesita un aumento de prácticamente 4000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de clortetraciclina y 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de tetraciclina u oxitetraciclina para que la absorbancia relativa porcentual se incremente en un 100%. Por el contrario, la sensibilidad del método para la doxiciclina es mejor, ya que un incremento de 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ resultan suficiente para alcanzar la máxima absorbancia relativa. Este hecho está en correspondencia con los valores de los coeficientes β_1 calculados en el Cuadro 33.

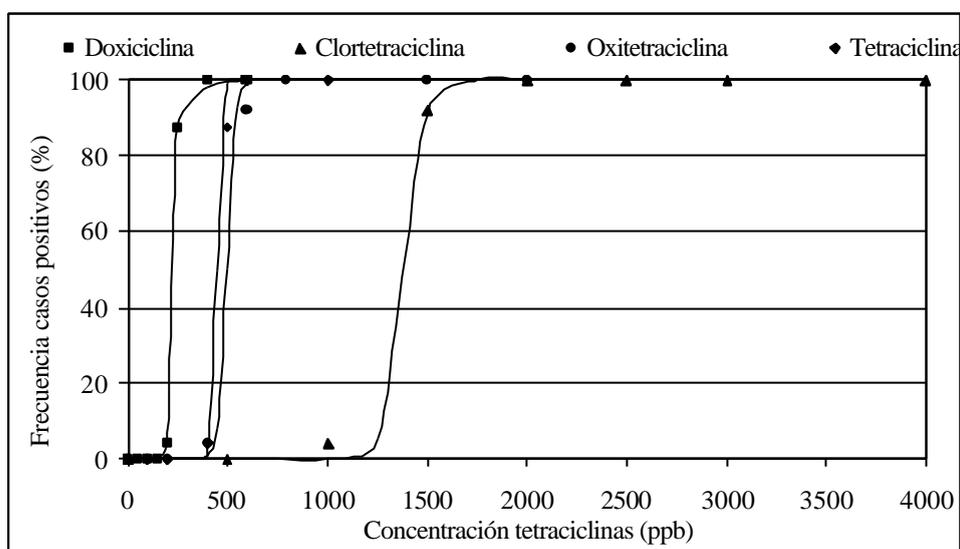


Figura 29. Efecto de la concentración de tetraciclinas sobre la frecuencia de casos positivos del método Eclipse® “100ov”

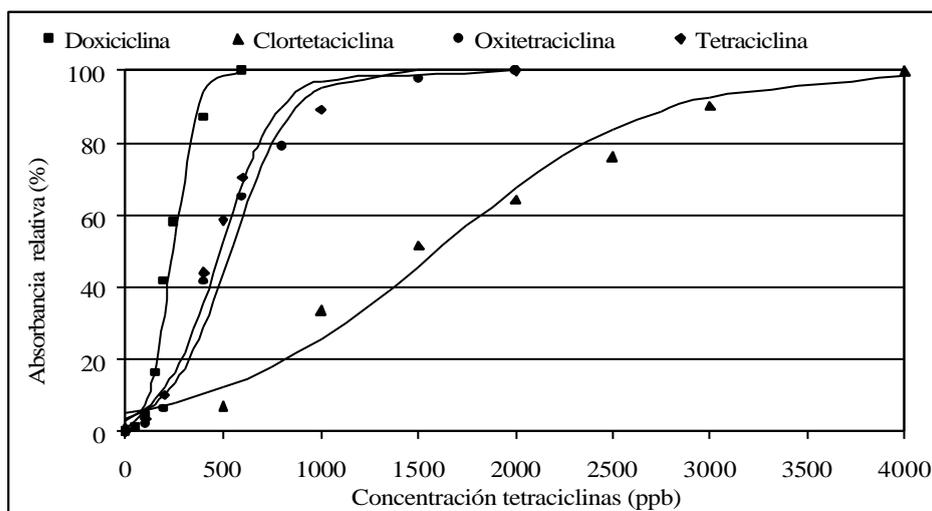


Figura 30. Efecto de la concentración de tetraciclinas sobre la absorbancia relativa del método Eclipse® “100ov”

1. 2. 5. 2. Límites de detección de tetraciclinas

A partir de los coeficientes β_0 y β_1 determinados en los Cuadro 33, se calcularon los límites de detección para cada una de las tetraciclinas estudiadas. En prácticamente todos los casos, a excepción de la clortetraciclina, se observa que los límites de detección calculados para las lecturas fotométricas resultaron levemente superiores a los obtenidos a partir de las interpretaciones visuales.

Cuadro 34. Límites de detección de tetraciclinas en leche de oveja para el método Eclipse® "100ov"

Tetraciclinas	Límites de detección ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		LMRs-UE	
	Visuales	Fotométricas	$\mu\text{g}/\text{kg}$	Especie
Clortetraciclina	1500	1500	100	Todas
Doxiciclina	260	230	---	---
Oxitetraciclina	560	500	100	Todas
Tetraciclina	480	460	100	Todas

Los límites de detección para los residuos de tetraciclinas en leche de oveja obtenidos mediante el método Eclipse® "100ov" (Cuadro 34), fueron similares a las 290 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de doxiciclina, 420 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de oxitetraciclina y 450 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de tetraciclina calculados por Althaus *et al.* (2002) para el método Delvotest®. Por el contrario, Molina *et al.* (2003b) señalan límites más elevados cuando utilizan el método BRT-AiM® (390 $\mu\text{g}/\text{kg}$ doxiciclina, 5500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ oxitetraciclina, 6200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ tetraciclina) con muestras de leche de oveja. Si embargo Althaus *et al.* (2003b) también con el método Delvotest® consigue mediante lecturas fotométricas valores inferiores para la doxicilcina (80 $\mu\text{g}/\text{kg}$) y la oxitetraciclina (320 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

En leche de vaca, Frank (1995) señala límites de detección de 5000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de oxitetraciclina y tetraciclina para otras versiones de Brilliant Black Reduction Test (BR-Test).

Mourot y Loussouarn (1981) al estudiar la sensibilidad del *Streptococcus thermophilus*, ampliamente utilizado en la fabricación de yoghurt, con diferentes concentraciones de tetraciclinas, observan cambios en los valores de pH para valores comprendidos entre 25-50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de oxitetraciclina o 50-100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de tetraciclina, lo que indica que a estas concentraciones hay una interferencia con el fermento y se dificulta la elaboración del producto. Además, dichos autores consideran que el *Streptococcus thermophilus* posee una buena sensibilidad para tetraciclinas, motivo por el cual podría ser utilizado como sensor microbiológico para la detección de estos.

Por su parte, Suhren y Heeschen (1993), analizan la sensibilidad a las tetraciclinas del *Bacillus cereus* presente en el Microtite Test[®], señalando límites de detección de 50-100 µg/kg para la tetraciclina y 50-70 µg/kg para la oxitetraciclina, valores que están por debajo de las 100 µg/kg establecidas para estos antibióticos como LMR por la UE.

Los estudios de Nouws *et al.* (1998) acerca de la sensibilidad hacia las tetraciclinas del *Bacillus calidolactis* a valores de pH 7,0 y pH 8,0 y del *Bacillus cereus* a pH 6,0, indican que el primer microorganismo permite detectar tetraciclinas en concentraciones comprendidas entre 40 y 45 µg/kg a un valor de pH 7,0, mientras que el segundo microorganismo de prueba, es sensible a 30 µg/kg de oxitetraciclina y tetraciclina.

Por otro lado, Nouws *et al.* (1999a,b) al emplear el *Bacillus cereus* ATCC 11778 a pH 6,0 detectan 100 µg/kg de oxitetraciclina o tetraciclina y 15 µg/kg de doxiciclina o clortetraciclina en leche de vaca.

También, el método Charm[®] II, que utiliza el *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* como receptor microbiológico, presenta mayor sensibilidad para detectar tetraciclinas que los métodos de inhibición microbiológica. Así, Charm y Ruth (1993) detectan concentraciones de 1 µg/kg de tetraciclina, 5 µg/kg de oxitetraciclina y 3 µg/kg de clortetraciclina en muestras de leche de vaca al emplear el citado método.

1. 2. 6. Detección de sulfonamidas en leche de oveja

1. 2. 6. 1. Efecto de la concentración de sulfonamidas sobre las lecturas visuales y fotométricas

La utilización del modelo logístico para el estudio del efecto de la concentración de sulfonamidas en leche de oveja sobre las calificaciones visuales y lecturas fotométricas del método microbiológico Eclipse[®] “100ov” presentó los parámetros que se resumen en el Cuadro 35.

Los valores de los coeficientes β_1 fueron bajos para las cuatro sulfonamidas estudiadas, en comparación con los calculados para los antibióticos betalactámicos (Cuadro 25), denotando la baja sensibilidad del método Eclipse[®] “100ov” para detectar residuos en la leche de oveja.

Cuadro 35. Resultados del modelo de regresión logística aplicado a la detección de sulfonamidas en leche de oveja con el método Eclipse® “100ov”

Sulfonamidas	Visuales			Fotométricas		
	β_0	β_1	C	β_0	β_1	C
Sulfadimetoxina	-10,088	0,076	99,2	-2,354	0,014	88,1
Sulfametazina	-4,517	0,010	95,0	-3,078	0,007	90,8
Sulfanilamida	-6,545	0,026	97,6	-3,534	0,015	94,0
Sulfatiazol	-19,092	0,087	98,9	-3,305	0,013	91,8

En la Figura 31, se presentan las variaciones en los porcentajes de las respuestas positivas del método para las cuatro sulfonamidas estudiadas

Con el propósito de profundizar el estudio de los resultados obtenidos mediante las interpretaciones visuales del método Eclipse® “100ov”, se construyó una gráfica que representa el efecto de la concentración de sulfonamida en leche de oveja sobre las lecturas fotométricas relativas de las microplacas (Figura 32).

En ambos casos se puede observar que la velocidad de respuesta del método Eclipse® “100ov” es más lenta para los incrementos de concentraciones de sulfametazina que para el resto de las sulfonamidas ensayadas. Este hecho está en correspondencia con los valores más bajo que posee el parámetro β_1 para esta sulfonamida.

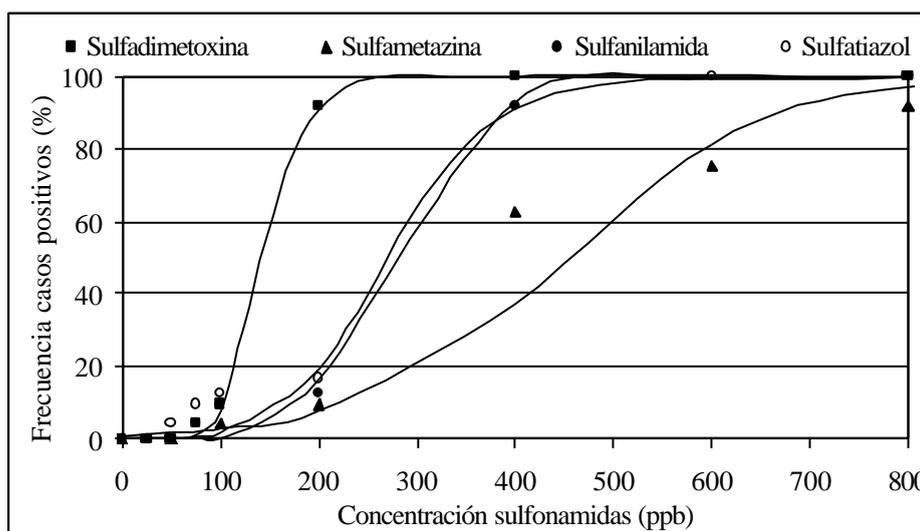


Figura 31. Efecto de la concentración de sulfonamidas sobre la frecuencia de casos positivos del método Eclipse® “100ov”

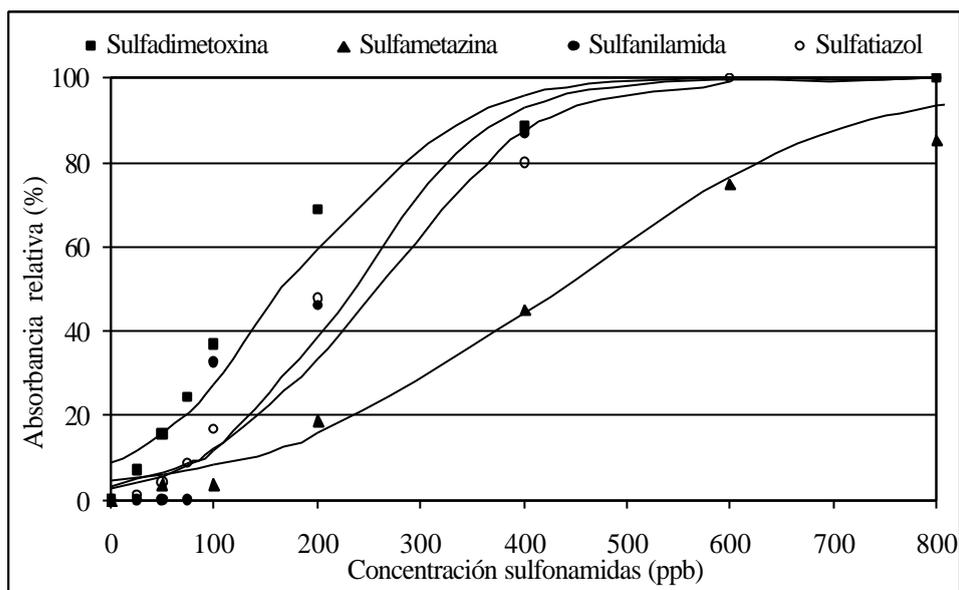


Figura 32. Efecto de la concentración de sulfonamidas sobre la absorbancia relativa del método Eclipse® “100ov”

1. 2. 6. 2. Límites de detección de sulfonamidas

Los límites de detección calculados a partir de las interpretaciones visuales y fotométricas del método Eclipse® “100ov” se resumen en el Cuadro 36. Se puede observar que este método microbiológico puede detectar algunas sulfonamidas (sulfadimetoxina y sulfatiazol) a concentraciones próximas al LMR-UE (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$), mientras que otras sulfonamidas deberán estar presentes en concentraciones más elevadas para poder ser puestas en evidencia con el método (Cuadro 36).

Cuadro 36. Límites de detección de sulfonamidas en leche de oveja para el método Eclipse® “100ov”

Sulfonamidas	Límites de detección ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		LMRs-UE	
	Visuales	Fotométricas	$\mu\text{g}/\text{kg}$	Especie
Sulfadimetoxina	170	157	100	Todas
Sulfametazina	750	405	100	Todas
Sulfanilamida	370	218	100	Todas
Sulfatiazol	250	237	100	Todas

Si bien el empleo del fotómetro y la utilización del criterio del 45% de la máxima absorbancia relativa porcentual permiten obtener límites de detección inferiores a los calculados a partir de las calificaciones visuales siendo todos

ellos (Cuadro 36), más elevados que los LMRs establecidos por la Unión Europea.

Al comparar los límites de detección obtenidos en leche de oveja mediante el método Eclipse® “100ov” con los calculados para otros métodos de inhibición microbiológica, se debe destacar que Althaus *et al.* (2002) obtienen niveles similares a los expuestos en el Cuadro 36 cuando utilizan el método Delvotest® y lecturas visuales con otras sulfonamidas (260 µg/kg sulfadiazina, 110 µg/kg sulfametoxazol, 430 µg/kg sulfametoxipiridazina y 190 µg/kg sulfaquinoxalina). Althaus *et al.* (2003b) calculan valores inferiores siendo éstos: sulfadiazina (88 µg/kg), sulfametoxazol (44 µg/kg), sulfametoxipiridazina (140 µg/kg) y sulfaquinoxalina (48 µg/kg), que resultan ser a su vez menores a los obtenidos en este estudio y a los LMRs–UE.

Aunque en otros estudios realizados mediante lecturas fotométricas, Molina *et al.* (2003b) señalan valores más elevados para los residuos de sulfadiazina (5400 µg/kg), sulfametoxazol (3200 µg/kg), sulfametoxipiridazina (6500 µg/kg) y sulfaquinoxalina (6200 µg/kg) en leche de oveja analizada por el método BRT AiM®.

Al utilizar otras versiones del BRT, Heeschen y Blüthgen (1991) y Charm y Ruth (1993) obtienen para la sulfadiazina un límite de detección de 1000 µg/kg, mientras que Franck (1995) señala valores más elevados (5000–10000 µg/kg) para la detección de sulfatiazol mediante el método BR-Test, ambos determinados en leche de vaca. Charm y Ruth (1993) indican 88 µg/kg de sulfadiazina, cuando el método Delvotest® se utiliza también con muestras de leche de vaca.

Una posibilidad para mejorar la detección de sulfonamidas es la incorporación de trimetoprim a una suspensión de *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*. Al respecto, Gudding (1976) destaca que la adición de 0,25 mg/kg de trimetoprim a una suspensión de este microorganismo permite detectar 100 µg/kg de sulfanilamida o sulfametazina y 10 µg/kg de sulfafenazol.

También, Nouws *et al.* (1995) mejoran la sensibilidad del *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* para la detección de sulfonamidas en muestras de leche de vaca, mediante la incorporación de trimetoprim en un medio a pH 8,0.

Otra alternativa para optimizar la detección de residuos de sulfonamidas en la leche es la utilización de otros microorganismos de prueba tales como *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Nouws *et al.* (1999a,b) llegan a detectar 75 µg/kg de sulfametazina, 50 µg/kg de sulfadiazina, 75 µg/kg de sulfadoxina, 50 µg/kg de sulfadimetoxina y 200 µg/kg de sulfanilamida en la leche de vaca.

2. SEGUNDO ESTUDIO: APLICACIÓN DEL SISTEMA MICROBIOLÓGICO MULTIPLACA (SMMP) EN LECHE DE OVEJA

2.1. DETECCIÓN DE ANTIMICROBIANOS MEDIANTE EL SISTEMA MICROBIOLÓGICO MULTIPLACA EN LECHE DE OVEJA

2. 1. 1. Efecto de la naturaleza de la leche

Con el objeto de aplicar el Sistema Microbiológico Multiplaca (SMMP) a la leche de oveja se realizó el presente experimento, en el que se analizaron la variación debida a los efectos del tipo de leche (vaca u oveja) y la preparación de diferentes porciones de medio de cultivo, así como la repetición de la medida, sobre el diámetro de la zona de inhibición.

De cada grupo de antimicrobiano estudiado, se eligió una sustancia representativa. Así, siguiendo las indicaciones de Nouws *et al.* (1999a), para la leche de vaca, las concentraciones de antimicrobianos ensayadas para los diferentes microorganismos utilizados como sensores del método fueron: 3 µg/kg de penicilina "G" (*Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*), 200 µg/kg de neomicina (*Bacillus subtilis* pH 8,0), 200 µg/kg de espiramicina (*Micrococcus luteus*), 400 µg/kg de flumequina (*Escherichia coli*), 100 µg/kg de oxitetraciclina (*Bacillus cereus*) y 100 µg/kg de sulfametazina (*Bacillus subtilis* pH 7,0).

En el Cuadro 37 se presentan los resultados del análisis de la varianza (ANOVA) del estudio de los efectos del Tipo de Leche (vaca u oveja), preparación del medio de cultivo (Medio Cultivo) y repetición de la medida (Medida) sobre los tamaños de las zonas de inhibición.

Cuadro 37. Resultados del ANOVA en el estudio de la adecuación del Sistema Microbiológico Multiplaca a la leche de oveja

Placa	Factores de variación					
	Tipo Leche		Medio Cultivo		Medida	
	"F"	"p"	"F"	"p"	"F"	"p"
<i>B. stearothermophilus</i>	561,55	0,0001	0,68	0,508	0,02	0,879
<i>B. subtilis</i> pH 8,0	949,41	0,0001	2,71	0,105	0,06	0,867
<i>M. luteus</i>	592,76	0,0001	2,20	0,085	1,34	0,252
<i>E. coli</i>	12429,64	0,0001	1,86	0,160	0,14	0,709
<i>B. cereus</i>	259,08	0,0001	0,25	0,728	1,28	0,262
<i>B. subtilis</i> pH 7,0	648,59	0,0001	0,02	0,881	0,31	0,577

En todos los casos se presentó un efecto significativo ($p < 0,001$) para el tipo de leche (vaca u oveja), mientras que los factores referentes a la preparación del medio y repetición de la medida no resultaron significativos, lo que pone de manifiesto la poca influencia de estos factores en los resultados obtenidos.

En el Cuadro 38 se pueden apreciar los valores de los diámetros de las zonas de inhibición, incluida la perforación, medidos para los distintos microorganismos de prueba utilizados. Como se observa, en todos los casos, los diámetros de los halos de inhibición obtenidos para cada antimicrobiano resultaron mayores y diferentes significativamente cuando se utiliza leche de vaca en comparación a los encontrados en leche de oveja.

Cuadro 38. Diámetros medios de las zonas de inhibición y desviación estándar (mm) de las diferentes placas para la leche de vaca y oveja

Placa	Diámetro del halo (mm)	
	Leche vaca	Leche oveja
<i>B. stearothermophilus</i>	20,76 _a + 0,15	19,40 _b + 0,15
<i>B. subtilis</i> pH 8,0	23,31 _a + 0,30	21,11 _b + 0,27
<i>M. luteus</i>	21,13 _a + 0,19	19,79 _b + 0,26
<i>E. coli</i>	22,08 _a + 0,15	18,17 _b + 0,13
<i>B. cereus</i>	22,02 _a + 0,34	18,07 _b + 0,30
<i>B. subtilis</i> pH 7,0	18,30 _a + 0,08	17,56 _b + 0,08

a,b: Diferentes subíndices en una misma fila señalan diferencias significativas a $p < 0,05$

Este hecho parece indicar una mayor velocidad de difusión cuando los agentes antimicrobianos se hallan presentes en muestras de leche bovina en comparación con la ovina, debido probablemente a la mayor concentración de sólidos totales que posee esta última, dificultando la migración de las sustancias inhibitoras hacia el medio de cultivo.

Las muestras de leche de vaca enriquecidas con 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de penicilina presentaron un diámetro medio de inhibición (20,76 mm) similar al determinado por Nouws *et al.* (1999a,b) cuando utiliza *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*. También resultaron similares los diámetros de los halos de inhibición de neomicina a 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (23,31 mm) en la placa de *B. subtilis* pH 8,0 y los 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de oxitetraciclina (22,02 mm) en la placa de *B. cereus* respecto a los valores señalados por dichos autores que obtuvieron en estas condiciones con leche de vaca diámetros de 22 mm.

Debido a las diferencias significativas en los tamaños de los halos de inhibición que se presentaron cuando se utiliza leche de oveja en comparación con la de vaca, se consideró necesario llevar a cabo el trabajo de validación del Sistema Microbiológico Multiplaca (SMMP) con muestras de leche de oveja enriquecidas mediante diferentes concentraciones de agentes antimicrobianos.

2. 1. 2. Validación del Sistema Microbiológico Multiplaca en leche de oveja

2.1.2.1. Concentración Mínima Inhibitoria

Para establecer los límites de detección del SMMP resulta necesario conocer previamente los valores de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para cada agente antimicrobiano estudiado.

La CMI se define como la concentración de un fármaco que produce un halo de inhibición detectable. En este sentido, numerosos autores (Vacher y Jemmi, 1997; Currie *et al.*, 1998; Tsai y Kondo, 2001, Calderón *et al.*, 2003) consideran como apreciable un incremento en el radio de la zona de inhibición de 1 mm.

En el Cuadro 39 se presentan los valores de las CMIs determinadas en leche de oveja. Para su cálculo, se utilizó como criterio el valor de la concentración de agente antimicrobiano que presentaba un diámetro, como mínimo de 16 mm, que corresponde a los 14 mm de la perforación que contiene la muestra y al incremento en el radio del halo de 1 mm (2 mm en el diámetro).

Cuadro 39. Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMIs) determinadas en leche de oveja para el Sistema Microbiológico Multiplaca

Antimicrobiano	CMI ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Antimicrobiano	CMI ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
<i>Betalactámicos</i>		<i>Macrólidos (cont.)</i>	
Penicilina "G"	2	Tilosina	250
Amoxicilina	4	<u>Quinolonas</u>	
Cloxacilina	30	Ciprofloxacina	25
Oxacilina	15	Enrofloxacin	25
Cefalexina	50	Flumequina	400
Cefadroxil	50	Norfloxacin	50
Cefoperazone	50	<u>Tetraciclinas</u>	
Cefuroxime	50	Clortetraciclina	25
<u>Aminoglucósidos</u>		Doxiciclina	25
Gentamicina	50	Oxitetraciclina	100
Kanamicina	300	Tetraciclina	100
Neomicina	200	<u>Sulfonamidas</u>	
Estreptomycin	400	Sulfadimetoxina	100
<u>Macrólidos</u>		Sulfametazina	100
Eritromicina	20	Sulfanilamida	200
Espiramicina	100	Sulfatiazol	100

2.1.2.2. Factores de variación de las determinaciones

Dado que el SMMP requiere de la preparación de las placas en el momento del análisis, se estimó conveniente llevar a cabo un estudio de repetibilidad de las respuestas de cada placa. Por ello se evaluaron los efectos que producen la “concentración” del antimicrobiano presente en la leche, la “preparación del medio de cultivo”, ya que se requiere la elaboración de diferentes medios, y la “interacción” entre ambos factores.

Para ello, se aplicó un diseño factorial 3 x 4 (3 medios de cultivo y 4 concentraciones) lo que supuso un total de 12 placas por antimicrobiano. En cada placa, siguiendo las indicaciones de la AOAC (1984), se colocó la muestra testigo (nivel intermedio de concentración), así como la concentración a estudiar, ambas por triplicado.

Los diámetros obtenidos, fueron corregidos utilizando el valor medio del diámetro de la concentración testigo en las 12 placas.

Para el estudio estadístico de los resultados, se aplicó un ANOVA que permitió evaluar los efectos de la “preparación del medio de cultivo” (Medio), la “concentración del antimicrobiano” (Concentración), así como la interacción entre ambos.

En el Cuadro 40 se resumen los resultados del análisis de la varianza aplicado en el estudio de los efectos mencionados sobre las medidas de los diámetros producidos en muestras de leche de oveja. Se puede observar que en todos los casos resultó significativo el efecto de la concentración del agente antimicrobiano ($p < 0,001$), mientras que la preparación del medio de cultivo y su interacción con la concentración no presentaron ningún efecto significativo ($p > 0,05$).

A partir de los resultados del Cuadro 40, se puede concluir que no existen diferencias entre las diferentes porciones de medio de cultivo preparadas sobre los resultados y que las únicas diferencias se deben a las distintas concentraciones de antimicrobiano. Este hecho, pone de manifiesto la repetibilidad del método, ya que los resultados obtenidos son independientes de la elaboración de las placas a partir de diferentes medios de cultivo.

2.1.2.3. Detección de betalactámicos mediante *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C953 en la leche de oveja

2.1.2.3.1. Detección de penicilinas

Los valores medios, desviaciones estándar y coeficientes de variación (repetibilidad) de los diámetros de los halos de inhibición obtenidos para las diferentes concentraciones de las cuatro penicilinas estudiadas en leche de oveja se muestran en el Cuadro 41.

Cuadro 40. Resultados del ANOVA para el estudio de los efectos “concentración”, “preparación del medio” y su interacción sobre el diámetro de la zona de inhibición en leche de oveja

Antimicrobianos	Concentración		Medio		Interacción	
	“F”	“p”	“F”	“p”	“F”	“p”
<u>Betalactámicos</u>						
Penicilina “G”	50,00	0,0001	1,43	0,248	0,88	0,421
Amoxicilina	528,62	0,0001	0,01	0,989	0,03	0,970
Cloxacilina	469,44	0,0001	0,10	0,901	0,02	0,977
Oxacilina	543,23	0,0001	0,16	0,851	0,19	0,826
Cefalexina	574,14	0,0001	0,09	0,911	0,45	0,638
Cefadroxil	584,88	0,0001	0,01	0,995	0,06	0,945
Cefoperazone	498,46	0,0001	0,19	0,824	0,19	0,828
Cefuroxime	523,74	0,0001	0,03	0,968	0,01	0,995
<u>Aminoglucósidos</u>						
Gentamicina	467,22	0,0001	0,89	0,416	0,25	0,778
Kanamicina	1801,24	0,0001	0,89	0,416	0,02	0,981
Neomicina	385,42	0,0001	0,01	0,987	0,08	0,921
Estreptomina	918,07	0,0001	0,68	0,509	0,47	0,875
<u>Macrólidos</u>						
Eritromicina	428,81	0,0001	0,02	0,983	0,02	0,977
Espiramicina	455,96	0,0001	0,03	0,968	0,04	0,957
Tilosina	473,77	0,0001	0,63	0,537	0,39	0,681
<u>Quinolonas</u>						
Ciprofloxacina	618,64	0,0001	0,02	0,985	0,06	0,939
Enrofloxacin	551,54	0,0001	0,16	0,853	0,10	0,901
Flumequina	718,65	0,0001	0,07	0,928	0,04	0,962
Norfloxacin	937,11	0,0001	0,02	0,984	0,01	0,993
<u>Tetraciclinas</u>						
Clortetraciclina	339,56	0,0001	0,17	0,841	0,09	0,918
Doxiciclina	580,31	0,0001	0,01	0,995	0,06	0,938
Oxitetraciclina	391,92	0,0001	0,13	0,880	0,06	0,946
Tetraciclina	315,41	0,0001	0,14	0,866	0,09	0,914
<u>Sulfonamidas</u>						
Sulfadimetoxina	888,07	0,0001	0,02	0,976	0,02	0,978
Sulfametazina	703,24	0,0001	0,02	0,980	0,01	0,993
Sulfanilamida	981,08	0,0001	0,01	0,996	0,01	0,999
Sulfatiazol	506,69	0,0001	0,41	0,663	0,22	0,802

Se puede observar en todos los casos que, los valores medios de los halos de inhibición aumentan conforme se incrementa la concentración y que presentan diferencias significativas para los niveles de concentraciones ensayados. No se aprecia superposición entre los rangos de los diámetros calculados para las diferentes concentraciones de cada penicilina analizada.

Para la penicilina “G” o benzilpenicilina, la desviación estándar del diámetro de los halos de inhibición correspondiente a la concentración de 16 $\mu\text{g}/\text{kg}$ fue más elevada (0,76 mm) en comparación con el resto de concentraciones utilizadas. Las concentraciones de 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 16 $\mu\text{g}/\text{kg}$ presentaron los mayores coeficientes de variación (2,61%, 2,09% y 2,47%, respectivamente), lo que indica una menor repetibilidad para estas concentraciones, siendo mayor la variabilidad entre los análisis repetidos.

Hay que señalar que de todas las penicilinas estudiadas, la amoxicilina presentó menores valores de los coeficientes de variación, que se hallan comprendidos entre 0,66% (16 $\mu\text{g}/\text{kg}$) y 0,93% (8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 32 $\mu\text{g}/\text{kg}$), lo que indica la buena repetibilidad de este antibiótico.

La cloxiciclina exhibió un halo de inhibición muy bajo (17,89 mm) para una concentración en leche equivalente al LMR establecido por la UE (30 $\mu\text{g}/\text{kg}$), acompañado de un mayor coeficiente de variación (2,49%).

Con respecto a la oxacilina (Cuadro 41), hay que destacar que, para una concentración equivalente al LMR, el diámetro fue elevado (25,50 mm) en comparación con los tamaños de los halos de la penicilina, amoxicilina y cloxacilina a concentraciones de sus LMRs (4 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente).

En general, se puede establecer que la repetibilidad de la placa del *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* ha sido buena para las cuatro penicilinas ensayadas, ya que los coeficientes de variación resultaron en todos los casos inferiores al 3,0%.

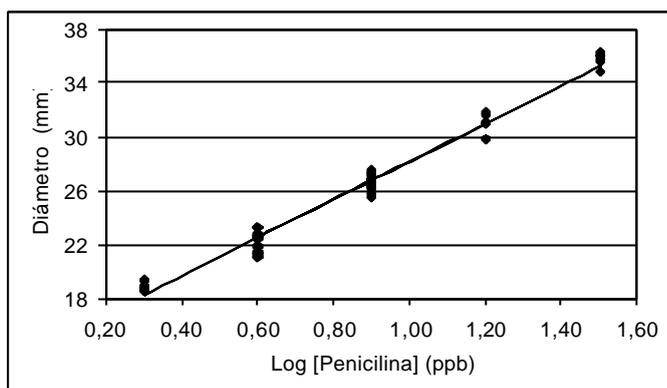
A fin de establecer la expresión matemática que relaciona el diámetro que incluye el halo de inhibición del *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* con los logaritmos decimales de las concentraciones de penicilinas presentes en muestras de leche de oveja, se utilizó un modelo de regresión lineal que establece la relación entre el diámetro de la zona de inhibición y el logaritmo de la concentración. La representación gráfica de las rectas obtenidas, así como las ecuaciones calculadas a partir del modelo y sus coeficientes de correlación se exponen en la Figura 33.

Cuadro 41. Efecto de la concentración de penicilinas en la leche de oveja sobre el diámetro del halo de inhibición de *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*

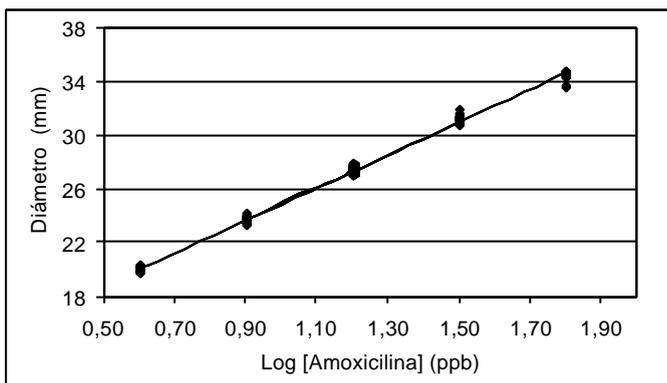
Penicilinas	Concentración (µg/kg)	n	Media	D.E.	Mínimo (mm)	Máximo (mm)	C.V. (%)
Penicilina "G"	2	9	18,87 _a	0,29	18,50	19,45	1,54
	4	9	21,99 _b	0,57	21,08	23,34	2,61
	8	36	26,56 _c	0,56	24,25	30,51	2,09
	16	9	30,81 _d	0,76	24,80	31,91	2,47
	32	9	35,87 _e	0,44	34,80	36,40	1,23
Amoxicilina	4	9	19,99 _a	0,18	19,70	20,31	0,90
	8	9	23,72 _b	0,22	23,32	24,11	0,93
	16	36	27,43 _c	0,18	27,02	27,89	0,66
	32	9	31,21 _d	0,27	30,70	31,81	0,87
	64	9	34,36 _e	0,32	33,50	34,77	0,93
Cloxacilina	30	9	17,89 _a	0,45	17,72	18,89	2,49
	60	9	21,98 _b	0,45	21,35	23,12	2,05
	120	36	25,88 _c	0,47	24,32	26,72	1,82
	240	9	29,74 _d	0,42	28,74	30,47	1,41
	480	9	32,99 _e	0,53	31,79	33,68	1,61
Oxacilina	15	9	21,32 _a	0,37	20,48	23,71	1,71
	30	9	25,50 _b	0,54	24,59	26,33	2,12
	60	36	29,30 _c	0,52	28,03	30,23	1,77
	120	9	32,91 _d	0,64	31,81	33,94	1,94
	240	9	36,64 _e	0,41	35,67	37,34	1,12

n: Número de determinaciones; D.E.: Desviación estándar; C.V.: Coeficiente de variación; a,b,c,d,e: Diferentes subíndices en una misma columna señalan diferencias significativas a $p < 0,05$

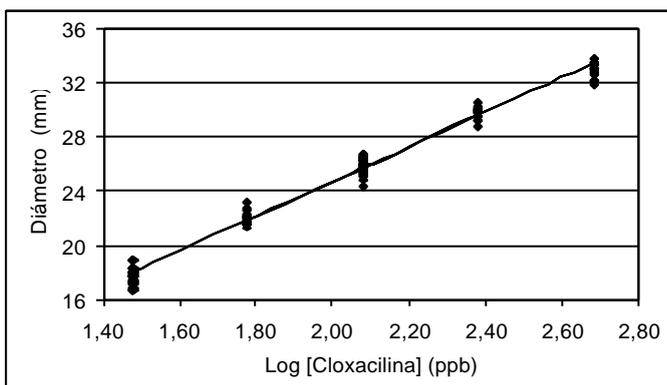
En la Figura 33 se observa que los incrementos en los tamaños de los halos de inhibición para iguales cambios en las concentraciones de penicilinas (1 unidad de logaritmo de concentración) resultan similares para las cuatro penicilinas ensayadas, debido a la semejanza en los valores de los coeficientes β_1 que reflejan el valor de la pendiente de las rectas de regresión.



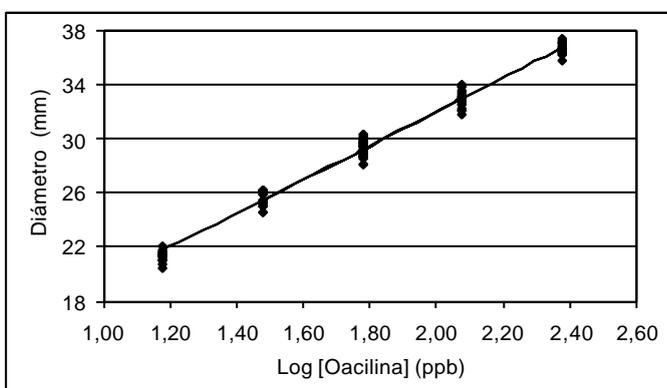
$D = 14,01 + 14,16 \log[\text{Penicilina}]$
 $R = 0,9855$



$D = 12,88 + 12,03 \log [\text{Amoxicilina}]$
 $R = 0,9981$



$D = -0,72 + 12,75 \log[\text{Cloxacilina}]$
 $R = 0,9922$



$D = 6,99 + 12,50 \log[\text{Oxacilina}]$
 $R = 0,9891$

Figura 33. Relación entre la concentración de penicilinas ($\mu\text{g}/\text{kg}$) en leche de oveja y el diámetro de la zona de inhibición (mm) de *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*

La penicilina presenta mayor valor de la pendiente (coeficiente β_1) debido a que *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* posee una elevada sensibilidad para este antimicrobiano, tal como se había observado en el primer estudio mediante el método microbiológico Eclipse® “100ov”. Los coeficientes de regresión fueron elevados en todos los casos, al estar comprendidos entre 0,9855 (penicilina) y 0,9981 (amoxicilina).

A partir de las ecuaciones de regresión de la Figura 33 se calcularon las concentraciones correspondientes a un diámetro de zona de inhibición de 18 mm (incremento de 2 mm del radio del halo), 20 mm (incremento de 3 mm) y 22 mm (incremento de 4 mm). Estas concentraciones junto a los LMR establecidos en la Unión Europea para la leche se recogen en el Cuadro 42.

Cuadro 42. Concentraciones de penicilinas correspondientes a diferentes diámetros (18, 20 y 22 mm) de la zona de inhibición en leche de oveja

Penicilinas	Concentraciones($\mu\text{g}/\text{kg}$)			LMRs-UE	
	$C_{18\text{mm}}$	$C_{20\text{mm}}$	$C_{22\text{mm}}$	μ/kg	Especie
Penicilina G	2	3	4	4	Todas
Amoxicilina	3	4	6	4	Todas
Cloxacilina	29	42	60	30	Todas
Oxacilina	8	11	16	30	Todas

$C_{18\text{mm}}$, $C_{20\text{mm}}$ y $C_{22\text{mm}}$: Concentraciones ($\mu\text{g}/\text{kg}$) correspondientes a diámetros de 18, 20 y 22 mm

Tal y como se puede apreciar en el Cuadro 42, para la penicilina, amoxicilina y cloxacilina, se observa que diámetros del halo de inhibición de 20 mm, se aproximan bastante a los LMR. Sin embargo en el caso de la oxacilina, todos los diámetros, incluso el de 22 mm, se corresponden con concentraciones inferiores al LMR establecido por la Unión Europea.

Tsai y Kondo (2001) obtienen un halo de inhibición superior a los 2 mm en el crecimiento del *Bacillus stearothermophilus* cuando utilizan 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de penicilina ó 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de amoxicilina en leche de vaca, niveles superiores a los expuestos en el Cuadro 42.

Cuando se aplica el Sistema Microbiológico Multiplaca para la detección de residuos de penicilina y amoxicilina en leche de vaca, Nouws *et al.* (1999a,b) determinan también un halo de inhibición de 20 mm para idénticas concentraciones de estos antimicrobianos (3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de penicilina y 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de amoxicilina) a las señaladas en el Cuadro 42. Mientras que dichos autores, requieren mayores concentraciones (30 $\mu\text{g}/\text{kg}$) de cloxacilina y oxacilina para conseguir un halo de ese tamaño.

Los límites de detección calculados para un diámetro de 20 mm en las distintas penicilinas (penicilina, amoxicilina y cloxacilina) mediante el SMMP en

leche de oveja (Cuadro 42) son inferiores a los límites estimados cuando se emplea el método de inhibición microbiológicos BRT-AiM[®] (Molina *et al.*, 2003b) y Eclipse[®] “100ov” (primer estudio). Sin embargo, estos límites de detección son ligeramente superiores a los obtenidos con el Delvotest “SP” (Althaus *et al.*, 2002, 2003b).

Por otra parte, diferentes estudios realizados en carne (Okerman *et al.*, 1998) mediante la aplicación del método “Four Plate Test” (FPT), muestran que a concentraciones de 30 µg/kg de penicilina, se consiguen halos de inhibición entre 20 y 22 mm, resultando esta concentración muy superior a la necesaria para aplicar el SMMP en leche.

Currie *et al.* (1998) empleando un método modificado del FPT, con muestras de tejido animal, consiguen un límite de detección de 50 µg/kg para la penicilina “G” y la amoxicilina, siendo éste superior al detectado mediante el SMMP. A su vez, Myllyniemi *et al.* (2001) mediante un método microbiológico de seis placas consiguen un límite de detección para la penicilina “G” de 20 µg/kg, cuando trabajan con tejido muscular.

2.1.2.3.2. *Detección de cefalosporinas*

En el Cuadro 43 se muestran los valores medios, desviaciones estándar, valores máximos y mínimos de los diámetros de las zonas de inhibición obtenidos para diferentes concentraciones de cefalosporinas en leche de oveja.

Al igual que en las penicilinas, el incremento en la concentración de cefalosporinas se traduce en un aumento en el tamaño de la zona de inhibición. En todos los casos, se observa que los mayores valores de desviación estándar se presentan para las concentraciones más elevadas de antimicrobianos, ya que la variabilidad en la respuesta es mayor a medida que aumenta la concentración. La repetibilidad del método para las cuatro cefalosporinas estudiadas fue muy adecuada, ya que los coeficientes de variación porcentual resultaron inferiores al 3,0%.

Para la cefalexina, el diámetro medio de la circunferencia obtenido para una concentración de 100 µg/kg, establecido como LMR por la UE, resultó ser de 19,80 mm, similar al valor de diámetro obtenido por Nouws *et al.* (1999a,b) para una concentración en leche de vaca de 80 µg/kg (20 mm de diámetro).

Por lo tanto, la cefalexina deberá estar presente en la leche de oveja a una concentración mayor para producir el mismo halo de inhibición que en la leche de vaca. Esto podría atribuirse a los mayores porcentajes de grasa y proteína que posee la leche de oveja en comparación con la leche de vaca, que podrían dificultar la difusión de la cefalexina en el medio de cultivo que contiene el microorganismo de método.

Cuadro 43. Efecto de la concentración de cefalosporinas en la leche de oveja sobre el diámetro de la zona de inhibición de *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*

Cefalosporinas	Concentración (µg/kg)	n	Media	D.E.	Mínimo (mm)	Máximo (mm)	C.V. (%)
Cefadroxil	50	9	17,89 _a	0,39	17,42	18,42	2,16
	100	9	21,29 _b	0,59	20,38	22,35	2,77
	200	36	26,14 _c	0,56	25,10	27,97	2,18
	400	9	29,72 _d	0,62	28,59	30,88	2,09
	800	9	33,17 _e	0,89	31,05	34,29	2,68
Cefalexina	50	9	16,49 _a	0,22	16,09	16,93	1,33
	100	9	19,80 _b	0,27	19,22	20,25	1,36
	200	36	22,58 _c	0,39	21,10	23,46	1,73
	400	9	27,97 _d	0,57	27,09	28,84	2,04
	800	9	31,36 _e	0,54	30,62	32,66	1,72
Cefoperazone	50	9	17,82 _a	0,35	16,57	18,50	1,95
	100	9	20,67 _b	0,22	20,36	21,00	1,06
	200	36	23,78 _c	0,34	22,84	24,46	1,43
	400	9	26,75 _d	0,21	26,40	27,09	0,79
	800	9	29,11 _e	0,22	28,69	29,55	0,76
Cefuroxime	50	9	17,92 _a	0,54	17,13	18,88	3,03
	100	9	22,01 _b	0,63	20,65	23,48	2,86
	200	36	25,92 _c	0,54	24,92	26,51	2,09
	400	9	29,43 _d	0,46	28,62	30,44	1,56
	800	9	33,06 _e	0,46	32,39	34,01	1,39

n: Numero de determinaciones; D.E.: Desviación estándar; C.V.: Coeficiente de variación; a,b,c,d,e: Diferentes subíndices en una misma columna señalan diferencias significativas a $p < 0,05$

A su vez, los residuos de cefoperazone deben estar presentes en la leche de oveja a una concentración de 100 µg/kg para producir un diámetro inhibitorio de 20,67 mm. En leche de vaca, Nouws *et al.* (1999a,b) obtienen un halo de inhibición similar al observado en el Cuadro 43 (20 mm) cuando utilizan una concentración menor (55 µg/kg) de cefoperazone.

Respecto al cefuroxime, hay que señalar que una concentración media de 100 µg/kg en leche de oveja produce un halo inhibitorio de 22,01 mm (Cuadro 43), aunque Nouws *et al.* (1999a,b) obtienen un halo inhibitorio de 20 mm para una concentración menor en leche de vaca (65 µg/kg). Sin embargo, en la leche de oveja, una concentración media de 50 µg/kg produce un halo inhibitorio de tan solo 17,92 mm (Cuadro 43). Una vez más, se puede

establecer que la composición de la leche de oveja muestra un efecto apreciable sobre la inhibición del crecimiento del microorganismo utilizado.

Con el propósito de calcular los valores de los límites de detección de cada cefalosporina en leche de oveja, se ensayó el modelo de regresión lineal que permite establecer la relación entre el diámetro del halo de inhibición y el logaritmo de la concentración de cefalosporina. Los resultados obtenidos se sintetizan en la Figura 34.

Se observa en dicha figura que cefadroxil, cefalexina y cefuroxime presentan mayores valores de sus pendientes (β_1) que cefoperazone, señalando la mayor sensibilidad del *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* cuando los primeros antimicrobianos se hallan presentes en leche de oveja. Además, estas tres cefalosporinas presentaron una mayor desviación estándar en el diámetro de los halos de inhibición para concentraciones de 800 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Cuadro 43). En comparación, el cefoperazone mostró menor desviación a esta concentración y además el valor del coeficiente de correlación ($R=0,9939$) fue el que presentó mejores resultados de todas las cefalosporinas ensayadas.

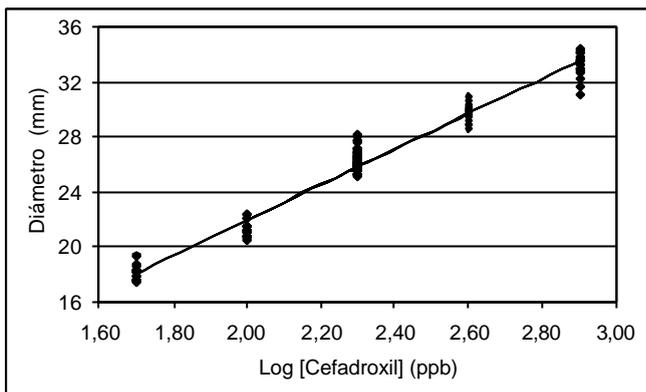
Por otra parte, en el Cuadro 44 se muestran las concentraciones calculadas, mediante las ecuaciones expuestas en la Figura 34, para los diferentes diámetros propuestos (18, 20 y 22 mm) para ser considerados como niveles de decisión, junto a los LMR, en el caso de las cefalosporinas.

Cuadro 44. Concentraciones de cefalosporinas correspondientes a diferentes diámetros (18, 20 y 22 mm) de la zona de inhibición en leche de oveja

Cefalosporinas	Concentraciones($\mu\text{g}/\text{kg}$)			LMRs-UE	
	C _{18mm}	C _{20mm}	C _{22mm}	$\mu\text{g}/\text{kg}$	Especie
Cefadroxil	49	70	100	-	-
Cefalexina	77	110	159	100	Vaca
Cefoperazone	51	82	133	50	Vaca
Cefuroxime	47	69	99	100	-

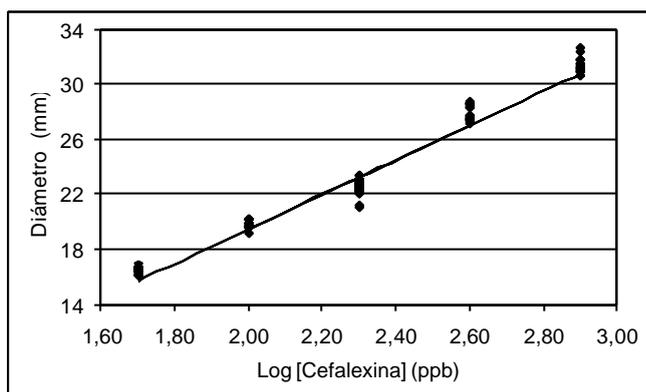
C_{18mm}, C_{20mm} y C_{22mm}: Concentraciones ($\mu\text{g}/\text{kg}$) correspondientes a diámetros de 18, 20 y 22 mm

Las concentraciones de cefalexina, cefoperazone y cefuroxime en leche de oveja que producen un aumento en el radio del halo de inhibición de 3 mm, lo que corresponde a un diámetro de 20 mm (C_{20mm}), resultaron levemente superiores a las calculadas por Nouws *et al.* (1999a,b) cuando utiliza el método multiplaca con leche de vaca (80 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 55 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 65 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente).



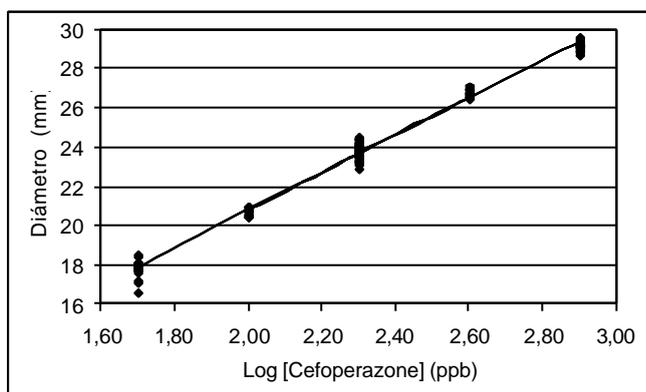
$$D = -3,68 + 12,82 \log[\text{Cefadroxil}]$$

$$R = 0,9752$$



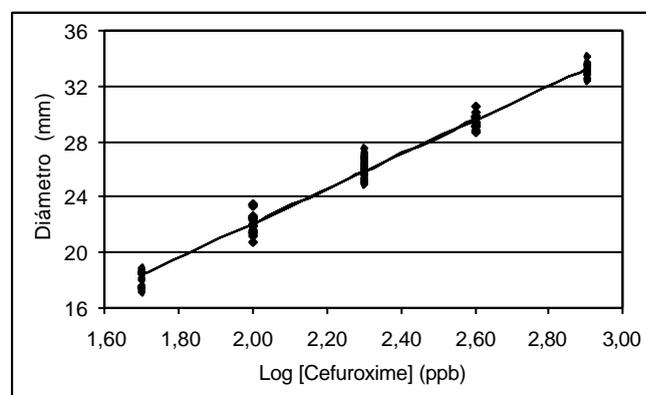
$$D = -5,73 + 12,59 \log[\text{Cefalexina}]$$

$$R = 0,9830$$



$$D = -1,69 + 9,56 \log[\text{Cefoperazone}]$$

$$R = 0,9939$$



$$D = -2,92 + 12,49 \log[\text{Cefuroxime}]$$

$$R = 0,9888$$

Figura 34. Relación entre la concentración de cefalosporinas ($\mu\text{g}/\text{kg}$) en leche de oveja y el diámetro de la zona de inhibición (mm) de *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*

Los niveles que producen una medida de diámetro de 18 mm también son bajos, resultando en algunos casos cercanos al LMR establecido por la Unión Europea en el caso de la cefalexina y cefoperazone. Por ello, los residuos en leche de oveja pueden detectarse mediante esta placa a niveles del LMR-UE, a partir de una inhibición de 18 mm. Los valores que corresponden a un diámetro de 20 mm son también cercanos a los LMR.

Hay que recordar que la placa que se utiliza para la detección de cefalosporinas es la misma que en el caso de las penicilinas (*Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*) por lo que resulta necesario establecer un criterio único para ambas familias pertenecientes al grupo de los betalactámicos. Por lo tanto se recomendaría considerar como nivel de decisión un diámetro de la circunferencia del halo de la zona de inhibición de 20 mm, a partir del cual se podría considerar que estos antimicrobianos a concentraciones semejantes al LMR-UE.

Los límites de detección correspondientes a un diámetro de 20 mm calculados mediante el Sistema Microbiológico Multiplaca son más bajos a los obtenidos para el método Eclipse[®] en el primer estudio para la cefalexina (109 µg/kg) y el cefoperazone (86 µg/kg). Para otros métodos de inhibición microbiológica, tales como los métodos BRT-AiM[®] y Delvotest[®], se obtienen límites de detección más elevados cuando se utilizan con muestras de leche de oveja fortificadas con las cuatro cefalosporinas ensayadas (Althaus *et al.*, 2002, 2003b, Molina *et al.*, 2003b).

Con el propósito de expresar de un modo gráfico las concentraciones que producen diferentes diámetros de inhibición en relación a los LMR de aquellos antibióticos betalactámicos establecidos por la Unión Europea, se construyó la Figura 35.

En dicha figura se ha utilizado una escala logarítmica (en base dos) estandarizada en unidades de LMR ("concentración que produce un diámetro fijo/LMR") (Suhren *et al.*, 1996, Reicmuth *et al.*, 1997). Esta escala logarítmica permite visualizar tamaños de halos de inhibición que presentan una relación "concentración/LMR" dentro de un rango de valores comprendidos entre 0,25 y 2 veces LMR.

Para aquellos fármacos cuyos halos de inhibición se sitúan a una distancia del centro equivalente al LMR-UE, se puede establecer que la placa presenta una buena sensibilidad. Por el contrario, aquellas sustancias que se sitúan más próximas al centro (entre 2 LMR y LMR), deberán estar presentes en mayores concentraciones para que el método sea capaz de detectarlas. A su vez aquellos halos de inhibición que se sitúen más alejados del centro de la gráfica (entre LMR y 0,25 veces LMR), serán detectados a concentraciones muy bajas, por debajo del LMR que señala la legislación, pudiendo dar lugar a penalizaciones injustas. A estos resultados se les denomina en ocasiones "falsos violativos" (del inglés "*false violatif*").

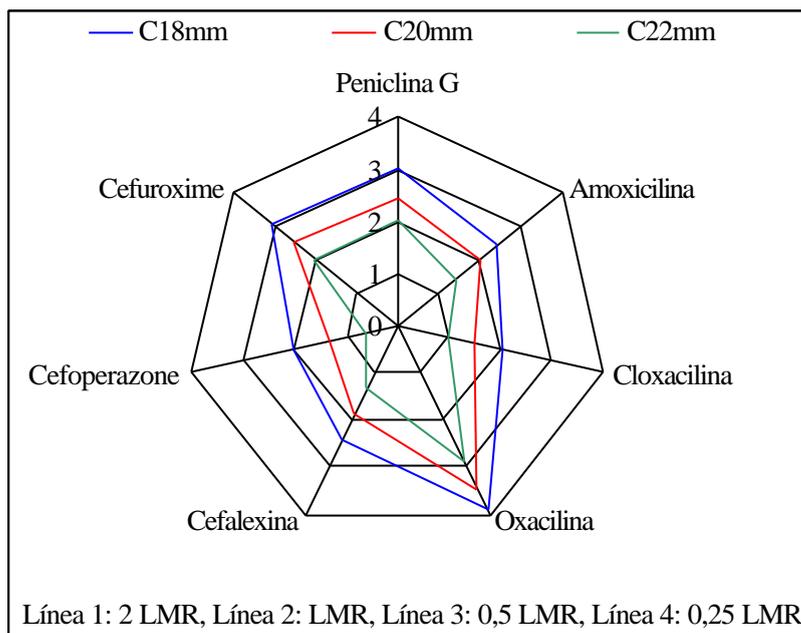


Figura 35. Comparación de las concentraciones que producen diferentes diámetros de inhibición con los LMR de antibióticos betalactámicos en leche de oveja

En la Figura 35 se puede apreciar que diámetros cercanos a los 18 mm produciría resultados "falsos violativos" para residuos de penicilina "G", cefuroxime y oxacilina, mientras que halos de inhibición mayores (comprendidos entre 20 y 22 mm) disminuirían la posibilidad de hallar estos resultados a los residuos de oxacilina.

Por ello, aquellas muestras de leche de oveja que presenten un halo de inhibición superior a los 20 mm deberían someterse a métodos de identificación y cuantificación posterior, como por ejemplo cromatografía HPLC a fin de verificar la presencia de algún antibiótico betalactámico.

2.1.2.4. Detección de aminoglucósidos mediante *Bacillus subtilis* BGA en la leche de oveja

La relación entre las concentraciones de aminoglucósidos y los diámetros de los halos de inhibición se exponen en el Cuadro 45, donde se puede apreciar también los valores de las desviaciones estándar, rangos y coeficientes de variación del método.

En todos los casos se observa un incremento de la variable respuesta en la medida que aumenta la concentración de aminoglucósido presente en la leche.

Los mayores valores de desviación estándar se obtienen para el caso de la gentamicina y la estreptomicina, en comparación con los de la kanamicina y neomicina.

Cuadro 45. Efecto de la concentración de aminoglucósidos en la leche de oveja sobre el diámetro del halo de inhibición de *Bacillus subtilis* BGA

Aminoglucósidos	Concentración (µg/kg)	n	Media	D.E.	Mínimo (mm)	Máximo (mm)	C.V. (%)
Gentamicina	50	9	20,57 _a	0,31	19,95	21,07	1,51
	100	9	24,23 _b	0,31	23,82	24,83	1,28
	200	36	26,36 _c	0,49	25,71	26,97	1,86
	400	9	28,19 _d	0,55	27,82	28,76	1,95
	800	9	30,93 _e	0,37	30,27	31,49	1,20
Kanamicina	50	9	20,13 _a	0,17	19,77	20,42	0,84
	100	9	25,26 _b	0,18	25,00	25,64	0,71
	200	36	30,35 _c	0,15	29,93	30,65	0,49
	400	9	33,28 _d	0,16	32,97	33,55	0,48
	800	9	35,52 _e	0,19	35,17	35,87	0,53
Neomicina	50	9	21,27 _a	0,14	21,00	21,56	0,66
	100	9	24,29 _b	0,10	24,13	24,44	0,41
	200	36	26,33 _c	0,13	25,93	26,61	0,49
	400	9	28,56 _d	0,24	28,26	29,07	0,84
	800	9	30,33 _e	0,25	30,08	30,87	0,82
Estreptomycin	50	9	21,94 _a	0,47	21,18	22,71	2,14
	100	9	25,41 _b	0,40	24,82	25,91	1,57
	200	36	28,41 _c	0,45	27,61	29,25	1,58
	400	9	30,40 _d	0,37	29,63	30,73	1,22
	800	9	33,20 _e	0,27	32,90	33,79	0,81

n: Número de determinaciones; D.E.: Desviación estándar; C.V.: Coeficiente de variación; a,b,c,d,e: Diferentes subíndices en una misma columna señalan diferencias significativas a $p < 0,05$

Para cada antimicrobiano, los rangos medidos para las diferentes concentraciones no se superponen y la repetibilidad del método fue adecuada, ya que los porcentajes de los coeficientes de variación fueron inferiores al 3%. Cabe señalar concretamente que los coeficientes de variación de la kanamicina y la neomicina resultaron en ambos casos muy bajos.

Los resultados del modelo de regresión lineal que relaciona los diámetros de los halos de inhibición con las transformaciones logarítmicas de las concentraciones de aminoglucósidos para las placas de *Bacillus subtilis* BGA y las rectas construidas mediante los parámetros estimados con el modelo se resumen en la Figura 36.

Se puede observar la linealidad en la respuesta que existe entre los diámetros de los halos de inhibición y los logaritmos decimales de las

concentraciones de aminoglucósidos ensayadas. La mayor pendiente que presenta la kanamicina en comparación con el resto de aminoglucósidos, pone de manifiesto una mayor velocidad de respuesta en la inhibición del *Bacillus subtilis* BGA.

En el Cuadro 46 se muestran los niveles de aminoglucósidos que producen un diámetro de inhibición de 18 mm ($C_{18\text{mm}}$), 20 mm ($C_{20\text{mm}}$), 22 mm ($C_{22\text{mm}}$) y los LMR-UE.

Cuadro 46. Concentraciones de aminoglucósidos correspondientes a diferentes diámetros (18, 20 y 22 mm) de la zona de inhibición en leche de oveja

Aminoglucósidos	Concentraciones($\mu\text{g}/\text{kg}$)			LMRs-UE	
	$C_{18\text{mm}}$	$C_{20\text{mm}}$	$C_{22\text{mm}}$	$\mu\text{g}/\text{kg}$	Especie
Gentamicina	20	35	62	100	Vaca
Kanamicina	155	222	317	150	Vaca
Neomicina	63	116	217	1500	Todas
Estreptomocina	154	242	381	200	Todas

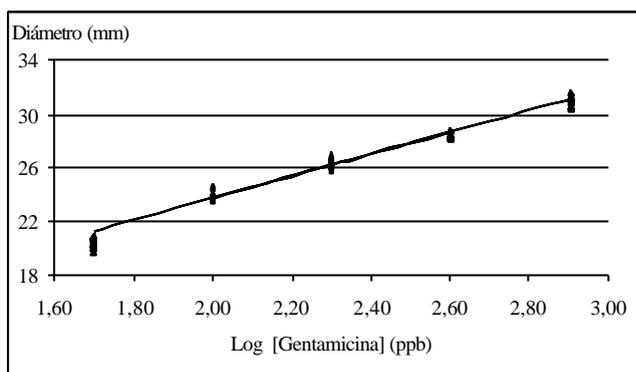
$C_{18\text{mm}}$, $C_{20\text{mm}}$ y $C_{22\text{mm}}$: Concentraciones ($\mu\text{g}/\text{kg}$) correspondientes a diámetros de 18, 20 y 22 mm

El *Bacillus subtilis* BGA presenta muy buena capacidad para detectar residuos de aminoglucósidos en leche de oveja, ya que concentraciones de 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (gentamicina), 155 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (kanamicina), 63 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (neomicina) y 154 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (estreptomocina) resultan suficientes para producir un incremento de 2 mm en el radio de inhibición (diámetro 18 mm).

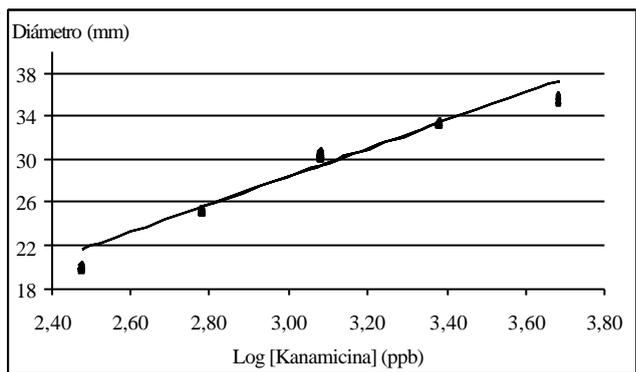
En leche de vaca, Nouws *et al.* (1999a,b) proponen un diámetro de decisión de 20 mm para concentraciones de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ gentamicina, 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ kanamicina y 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ neomicina, que resultan superiores a las calculadas en muestras de leche de oveja para obtener un mismo diámetro de 20 mm (Cuadro 46).

Hay que señalar que las concentraciones que más se aproximan al LMR del aminoglucósido gentamicina son las que producen un diámetro de la zona de inhibición de 22 mm ($C_{22\text{mm}}$; Cuadro 46). En el caso de la kanamicina el más cercano es $C_{18\text{mm}}$. Para la estreptomocina se consideraría más adecuado el diámetro que se obtiene con concentraciones $C_{20\text{mm}}$. Por ello, en el caso de este grupo de antibióticos medidas comprendidas entre los 18 mm y 22 mm indicarían su presencia en cantidades aproximadas, en la mayoría de los casos a los límites legales.

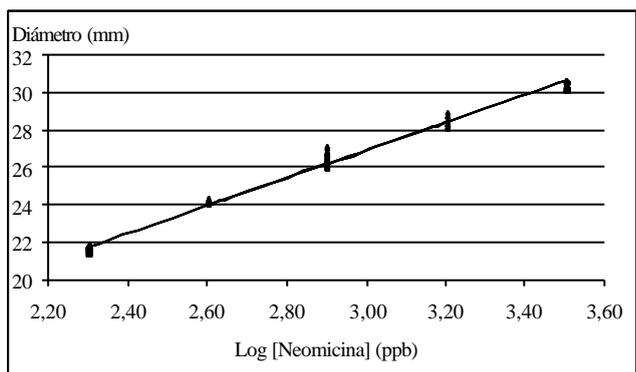
Sin embargo, la neomicina presenta en los tres diámetros calculados concentraciones muy inferiores al LMR, que actualmente es de 1500 $\mu\text{g}/\text{kg}$, que hasta hace poco era menor (500 $\mu\text{g}/\text{kg}$).



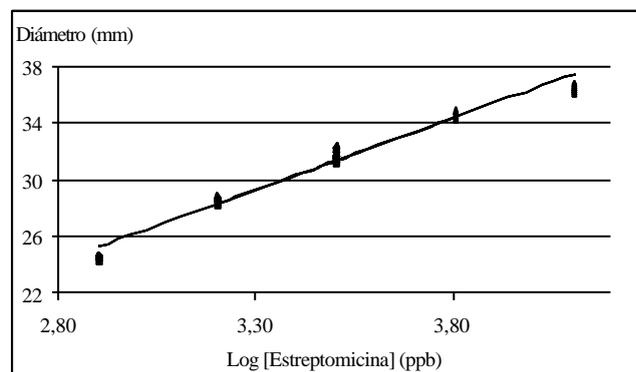
$D = 7,36 + 8,17 \log[\text{Gentamicina}]$
 $R = 0,9765$



$D = -10,26 + 12,89 \log[\text{Kanamicina}]$
 $R = 0,9719$



$D = 4,62 + 7,44 \log[\text{Neomicina}]$
 $R = 0,9929$



$D = -4,18 + 10,14 \log[\text{Estreptomicina}]$
 $R = 0,9871$

Figura 36. Relación entre la concentración de aminoglucósidos ($\mu\text{g}/\text{kg}$) en leche de oveja y el diámetro de la zona de inhibición (mm) de *Bacillus subtilis* BGA

Currie *et al.* (1998), cuando utilizan *Bacillus subtilis* BGA a diferentes valores de pH, logran obtener un radio inhibitorio de 2 mm, empleando discos de papel de filtro de 6 mm de diámetro, para 49 µg/kg de gentamicina (pH 7,2), 12,5 µg/kg de kanamicina (pH 7,2) y 25 µg/kg de neomicina (pH 8,0). Resulta necesario destacar que Tsai y Kondo (2001) observan un halo inhibitorio de 2 mm de radio en el crecimiento del *Bacillus subtilis* ATCC 6633, para concentraciones mayores de gentamicina (780 µg/kg) y kanamicina (780 µg/kg) a las calculadas en este trabajo.

Para los aminoglucósidos en la Figura 37 se muestra las relaciones entre las concentraciones para diferentes diámetros de inhibición respecto a los LMR establecidos por la Unión Europea. En este caso, debido a la mayor amplitud de los cocientes "concentración/LMR" se ha utilizado una escala logarítmica en base 10.

De los cuatro aminoglucósidos ensayados, *Bacillus subtilis* BGA presenta muy buena sensibilidad para los residuos de gentamicina, ya que concentraciones comprendidas entre 0,1 veces el LMR y LMR resultan suficientes para producir un diámetro de inhibición de 18 mm, dando lugar a resultados "falsos violativos", mientras que concentraciones de kanamicina y estreptomycinina cercanas al LMR originan halos de 18 mm. La neomicina sin embargo, es detectada a niveles muy bajos en comparación con el LMR.

A partir de los resultados representados en dicha figura se puede establecer que sería conveniente someter a análisis de identificación y cuantificación posterior, aquellas muestras de leche que formen diámetros de inhibición cercanos a los 20 mm en la placa de *Bacillus subtilis* BGA.

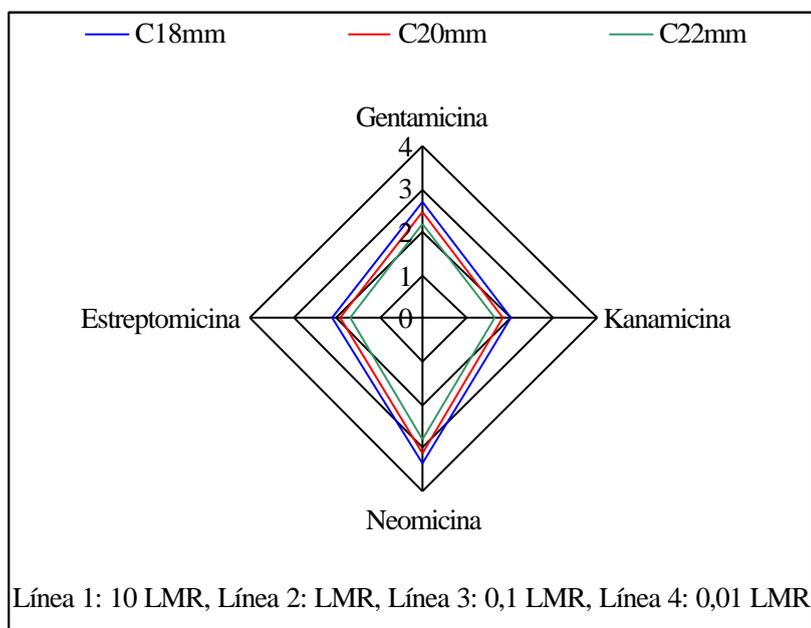


Figura 37. Comparación de las concentraciones que producen diferentes diámetros de inhibición con los LMR de aminoglucósidos en leche de oveja

2.1.2.5 Detección de macrólidos mediante *Micrococcus luteus* ATTC 9341 en la leche de oveja

Los valores medios, desviación estándar, rangos y coeficientes de variación para las diferentes concentraciones de macrólidos utilizadas se resumen en el Cuadro 47. Se observa una buena respuesta del *M. luteus* ATCC 9341 para las diferentes concentraciones ensayadas.

Cuadro 47. Efecto de la concentración de macrólidos en la leche de oveja sobre el diámetro de la zona de inhibición del *Micrococcus luteus* ATCC 9341

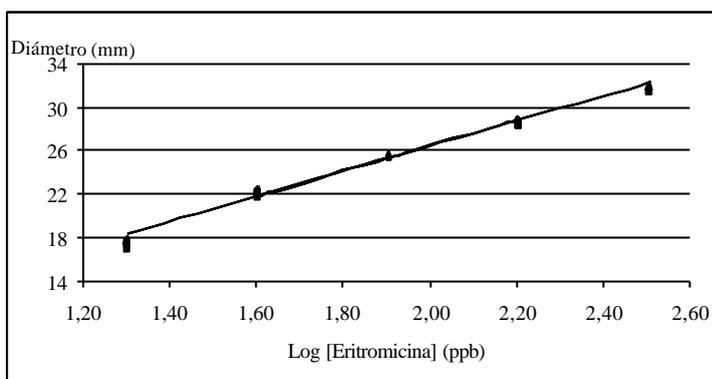
Macrólidos	Concentración (µg/kg)	n	Media	D.E.	Mínimo (mm)	Máximo (mm)	C.V. (%)
Eritromicina	20	9	17,55 _a	0,25	16,91	17,88	1,42
	40	9	22,14 _b	0,25	21,67	22,59	1,13
	80	36	25,52 _c	0,11	25,26	25,83	0,43
	160	9	28,68 _d	0,24	28,28	29,05	0,84
	320	9	31,70 _e	0,19	31,33	31,97	0,60
Espiramicina	100	9	17,39 _a	0,18	17,22	17,87	1,04
	200	9	21,26 _b	0,26	20,81	21,64	1,22
	400	36	24,48 _c	0,10	24,11	24,72	0,41
	800	9	27,58 _d	0,19	27,31	27,86	0,69
	1600	9	30,29 _e	0,15	30,00	30,50	0,50
Tilosina	250	9	17,24 _a	0,37	16,71	17,74	2,12
	500	9	20,21 _b	0,22	19,95	20,69	1,09
	1000	36	22,50 _c	0,12	22,21	22,79	0,53
	2000	9	25,50 _d	0,17	25,21	25,86	0,67
	4000	9	27,64 _e	0,27	26,95	27,91	0,98

n: Número de determinaciones; D.E.: Desviación estándar; C.V.: Coeficiente de variación; a,b,c,d,e: Diferentes subíndices en una misma columna señalan diferencias significativas a $p < 0,05$

En efecto, el incremento en la concentración de eritromicina, espiramicina y tilosina producen cambios en el tamaño de los diámetros que van desde valores levemente superiores a los 17 mm para los tres macrólidos hasta 31,70 mm para la eritromicina, 30,29 mm para la espiramicina y 27,64 mm para la tilosina.

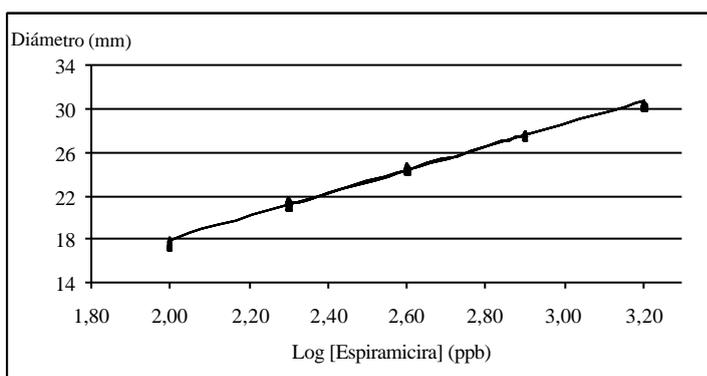
Para cada macrólido estudiado, no se observa una superposición de los rangos obtenidos para los diferentes niveles de concentración. Los valores de las desviaciones estándar fueron bajos en todos los casos, hecho que se ve reflejado en los porcentajes de coeficientes de variación del método, entre 0,48 y 2,12% lo que indica una repetibilidad muy adecuada (menor del 3%).

La aplicación del modelo de regresión lineal que permite establecer la función entre los diámetros de las zonas de inhibición del *M. luteus* ATCC 9341 y el logaritmo decimal de la concentración de macrólidos, presentó los valores que se resumen en la Figura 38.



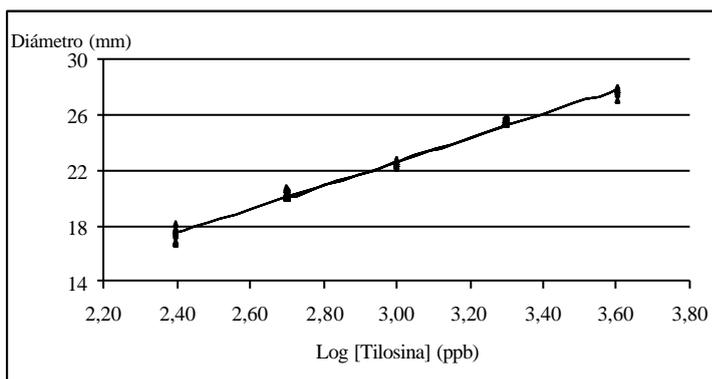
$$D = 3,24 + 11,57 \log[\text{Eritromicina}]$$

$$R = 0,9939$$



$$D = -3,46 + 10,67 \log[\text{Espiramicina}]$$

$$R = 0,9962$$



$$D = -3,18 + 8,59 \log[\text{Tilosina}]$$

$$R = 0,9955$$

Figura 38. Relación entre la concentración de macrólidos ($\mu\text{g}/\text{kg}$) en leche de oveja y el diámetro de la zona de inhibición (mm) de *Micrococcus luteus* ATCC 9341

En dicha figura, cuando se comparan los aumentos de los diámetros de inhibición observados para la tilosina, con los obtenidos para la eritromicina y la espiramicina, resulta evidente el menor incremento en el tamaño del halo inhibitorio de la tilosina en la leche de oveja en comparación con los otros dos macrólidos, para iguales aumentos en sus concentraciones.

A su vez en el Cuadro 48, se exponen los valores de la concentraciones que producen un diámetro de 18, 20, 22 mm junto a los LMRs-UE, para los macrólidos ensayados.

Las concentraciones de eritromicina y espiramicina necesarias para producir un diámetro de la zona de inhibición de 18 mm y 20 mm resultan inferiores al LMR, sin embargo diámetros de 22 mm corresponden a concentraciones semejantes para la eritromicina y ligeramente superiores para la espiramicina al LMR.

En lo que se refiere a la detección de la tilosina todos los diámetros estudiados (18, 20 y 22 mm) están producidos por concentraciones muy superiores al LMR establecido por la UE.

Diversos estudios realizados en leche de vaca señalan que niveles de 30 µg/kg de eritromicina, 150 µg/kg de espiramicina y 500 µg/kg de tilosina producen una halo de inhibición de 22 mm cuando se utiliza el *M. luteus* ATCC 9341 como sensor biológico (Nouws *et al.*, 1999a,b). Estos valores resultan similares a las concentraciones señaladas en el Cuadro 48, ya que producen un diámetro cercano a los 22 mm (42 µg/kg de eritromicina, 243 µg/kg de espiramicina). Sin embargo para la tilosina tendríamos que considerar concentraciones de 500 µg/kg con diámetros de inhibición de 20 mm. Las concentraciones señaladas por estos autores se encuentran comprendidas entre las calculadas en este trabajo para diámetros de 20 y 22 mm

Cuadro 48. Concentraciones de macrólidos correspondientes a diferentes diámetros (18, 20 y 22 mm) de la zona de inhibición en leche de oveja

Macrólidos	Concentraciones µg/kg			LMRs-UE	
	C _{18mm}	C _{20mm}	C _{22mm}	µg/kg	Especie
Eritromicina	19	28	42	40	Todas
Espiramicina	103	158	243	200	Vaca
Tilosina	293	500	855	50	Todas

C_{18mm}, C_{20mm} y C_{22mm}: Concentraciones (µg/kg) correspondientes a diámetros de 18, 20 y 22 mm

Currie *et al.* (1998), cuando emplean el mismo microorganismo, llegan a detectar 25 µg/kg de espiramicina y 25 µg/kg de tilosina para un incremento en el radio de la zona inhibitoria equivalente a 2 mm. También, Tsai y Kondo (2001) señalan una concentración mínima detectable de 50 µg/kg de

eritromicina y 390 µg/kg de tilosina, capaz de producir el mismo incremento en el radio (2 mm) del halo de inhibición en el crecimiento del *M. luteus* ATCC 9341.

Resulta conveniente recordar que un incremento en el radio de 2 mm es equivalente, en el presente trabajo, a un diámetro de 18 mm, ya que la medida incluye el diámetro de circunferencia de la perforación (14 mm).

Hay que mencionar que *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* utilizado como microorganismo en los métodos de inhibición microbiológica detecta niveles muy superiores de eritromicina en leche de oveja; 630 µg/kg para el método BRT-AiM[®] (Molina *et al.*, 2003b) y 980 µg/kg para el método Delvotest[®] (Althaus *et al.*, 2002, 2003b) por lo que no son adecuados para la detección de este grupo de antimicrobianos.

El método Eclipse[®] “100ov”, que emplea el mismo microorganismo de prueba que los métodos comentados anteriormente, presenta una menor sensibilidad al detectar concentraciones más elevadas de eritromicina (700 µg/kg) y espiramicina (15500 µg/kg). Sin embargo, los límites de detección de la tilosina para los métodos BRT-AiM[®] (120 µg/kg; Molina *et al.*, 2003b), Delvotest[®] (120 µg/kg; Althaus *et al.*, 2003b) y Eclipse[®] “100ov” (220 µg/kg; Montero *et al.*, 2004) son inferiores al calculado para un aumento del radio inhibitorio de 2 mm en la placa que contiene *M. luteus* ATCC 9341 ($C_{18mm} = 293$ µg/kg, Cuadro 48). Este hecho pone de manifiesto una interferencia del antibiótico tilosina con *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*.

La Figura 39 presenta la relación entre los logaritmos decimales de las concentraciones que producen diámetros fijos de los halos de inhibición (18, 20 y 22 mm) respecto a los LMR-UE para los tres macrólidos estudiados.

Tanto los residuos de eritromicina como los de espiramicina producen halos de inhibición de 18 mm para concentraciones más bajas a los LMR, acompañado de la posibilidad de brindar resultados "falsos violativos", mientras que la tilosina debe hallarse a elevadas concentraciones (comprendidas entre LMR y 10 veces LMR) para producir un halo de inhibición de tan solo 18 mm. Se debe tener presente que este macrólido también es detectado por *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*, tal como se señala posteriormente en el estudio de especificidad cruzada.

Por estos motivos, diámetros comprendidos entre los 20 y 22 mm (“nivel de decisión”) revelan la posible presencia de residuos de eritromicina y espiramicina a niveles cercanos a los LMR, mientras la presencia simultánea de halos de 18 mm en la placa de *Micrococcus luteus* ATCC 9341 y la placa de *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* puede deberse a los residuos de tilosina en la leche.

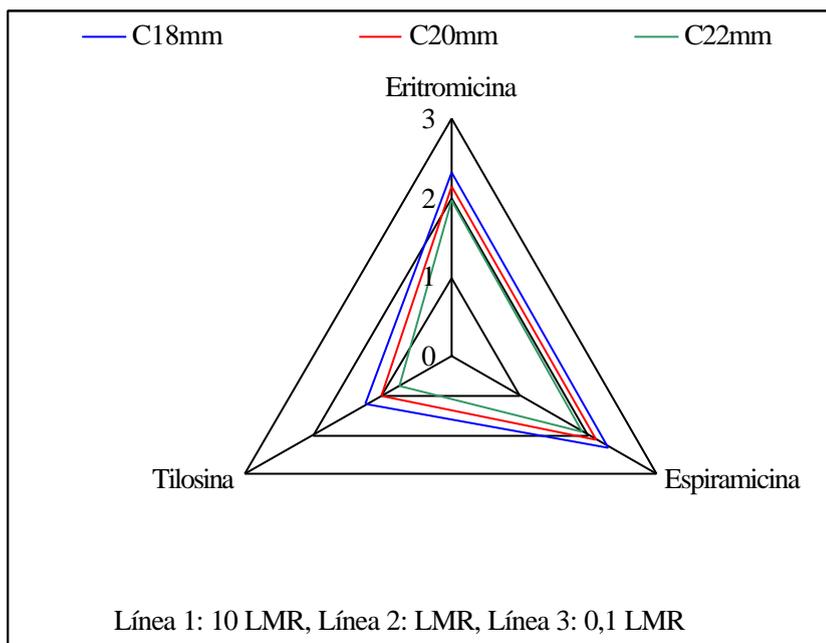


Figura 39. Comparación de las concentraciones que producen diferentes diámetros de inhibición con los LMR de macrolidos en leche de oveja

2.1.2.6. Detección de quinolonas mediante *Escherichia coli* ATCC 11303 en la leche de oveja

En el Cuadro 49 se representa el efecto de la concentración de quinolonas sobre el diámetro de inhibición formado en la placa *E. coli* ATCC 11303. Los tamaños de los halos de inhibición aumentan en la medida que se incrementa la concentración de quinolonas. Los mayores diámetros de inhibición se presentan en concreto en la ciprofloxacina que llega a alcanzar valores medios de 33,78 mm para una concentración de 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Para la flumequina la desviación estándar a la concentración de 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ fue la más elevada (0,26) en comparación con el resto de concentraciones crecientes ensayadas.

Hay que señalar que de todas las quinolonas ensayadas, la norfloxacina fue la que presentó coeficientes de variación más bajos (0,28-0,57%). Los coeficientes de variación fueron inferiores al 2% en todos los casos, por lo que se puede considerar que la repetibilidad de la placa fue muy buena para este antimicrobiano.

A su vez, en la Figura 40 se presentan las ecuaciones de regresión junto a sus rectas correspondientes para las cuatro quinolonas estudiadas. En todas ellas se obtuvieron unos coeficientes de correlación muy elevados con valores comprendidos entre 0,9830 y 0,9986.

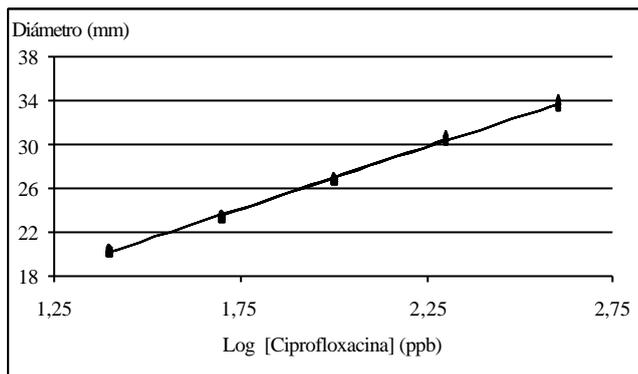
Cuadro 49. Efecto de la concentración de quinolonas en la leche de oveja sobre el diámetro de la zona de inhibición del *Escherichia coli* ATCC 11303

Quinolonas	Concentración (µg/kg)	n	Media	D.E.	Mínimo (mm)	Máximo (mm)	C.V. (%)
Ciprofloxacina	25	9	20,31 _a	0,15	20,12	20,69	0,74
	50	9	23,55 _b	0,18	23,17	23,80	0,76
	100	36	26,89 _c	0,12	26,65	27,22	0,45
	200	9	30,57 _d	0,25	30,15	30,96	0,82
	400	9	33,78 _e	0,26	33,34	34,31	0,77
Enrofloxacina	25	9	17,42 _a	0,35	16,84	17,87	2,00
	50	9	21,26 _b	0,11	21,08	21,48	0,52
	100	36	24,93 _c	0,34	24,37	27,45	1,36
	200	9	27,87 _d	0,09	27,62	27,99	0,32
	400	9	31,12 _e	0,18	30,76	31,38	0,58
Flumequina	400	9	17,41 _a	0,26	16,96	17,76	1,49
	800	9	19,93 _b	0,13	19,74	20,12	0,65
	1600	36	23,58 _c	0,11	23,33	23,82	0,47
	3200	9	29,52 _d	0,21	29,14	29,81	0,71
	6400	9	33,36 _e	0,14	33,19	33,63	0,42
Norfloxacina	50	9	17,42 _a	0,10	17,26	17,64	0,57
	100	9	20,53 _b	0,15	20,32	20,82	0,73
	200	36	24,59 _c	0,09	24,36	24,76	0,37
	400	9	27,67 _d	0,13	27,44	27,95	0,47
	800	9	31,93 _e	0,09	31,79	32,11	0,28

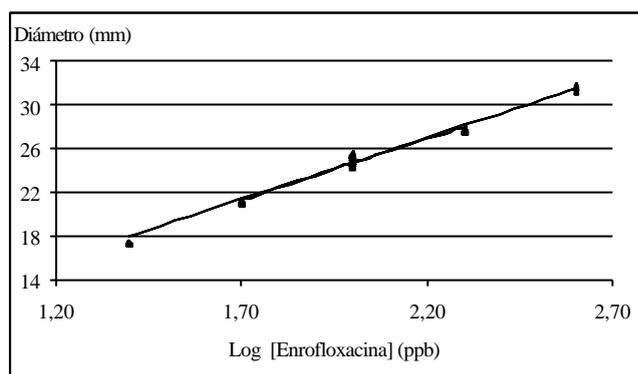
n: Número de determinaciones; D.E.: Desviación estándar; C.V.: Coeficiente de variación; a,b,c,d,e: Diferentes subíndices en una misma columna señalan diferencias significativas a $p < 0,05$

A partir de estas ecuaciones se obtuvieron las concentraciones para los diferentes diámetros de zona de inhibición planteados que se presentan en el Cuadro 50 junto a los LMR establecidos por la legislación para estas sustancias.

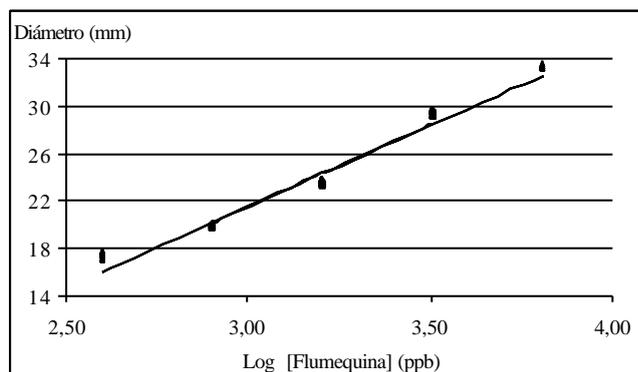
Para el caso de la enrofloxacina, quinolona cuyo LMR establecido por la Unión Europea es de 100 µg/kg (es importante señalar que este valor es la suma del residuo de enrofloxacina y ciprofloxacina, que no presenta LMR de modo individual) para la leche de vaca, se puede observar que *E. coli* ATCC 11303 permite detectar 58 µg/kg cuando la zona de inhibición presentó un diámetro de 22 mm (Cuadro 50) en leche de oveja, valor inferior al LMR-UE.



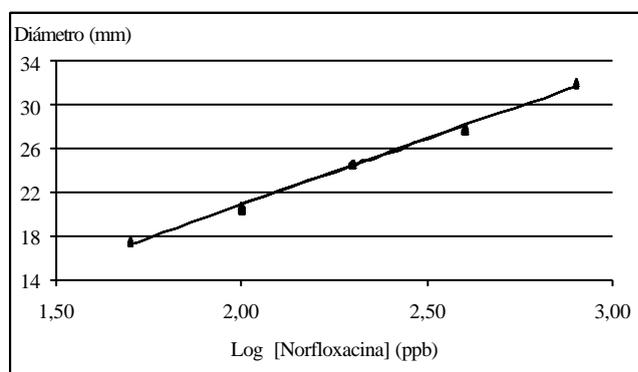
$D = 4,39 + 11,29 \log[\text{Ciprofloxacin}]$
 $R = 0,9986$



$D = 2,08 + 11,29 \log[\text{Enrofloxacin}]$
 $R = 0,9946$



$D = -19,86 + 13,79 \log[\text{Flumequina}]$
 $R = 0,9830$



$D = -3,13 + 12,00 \log[\text{Norfloxacin}]$
 $R = 0,9981$

Figura 40. Relación entre la concentración de quinolonas ($\mu\text{g}/\text{kg}$) en leche de oveja y el diámetro de la zona de inhibición (mm) de *Escherichia coli* ATCC 11303

Cuadro 50. Concentraciones de quinolonas correspondientes a diferentes diámetros (18, 20 y 22 mm) de la zona de inhibición en leche de oveja

Quinolonas	Concentraciones ($\mu\text{g}/\text{kg}$)			LMRs-UE	
	C _{18mm}	C _{20mm}	C _{22mm}	$\mu\text{g}/\text{kg}$	Especie
Ciprofloxacina	16	24	36	-	-
Enrofloxacin	26	39	58	100	Todas*
Flumequina	557	778	1087	50	Todas
Norfloxacin	58	85	124	-	-

C_{18mm}, C_{20mm} y C_{22mm}: Concentraciones ($\mu\text{g}/\text{kg}$) correspondientes a diámetros de 18, 20 y 22 mm; * Suma de residuos de enrofloxacin y ciprofloxacina

Nouws *et al.* (1999a,b), al utilizar la placa de *E. coli* ATCC 11303 con leche de vaca enriquecida con quinolonas, observan halos inhibitorios de 18 mm para 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de enrofloxacin y 175 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de flumequina, valores más bajos que las C_{18mm} señaladas en el Cuadro 50 para ambas quinolonas.

Sin embargo en el caso concreto de la flumequina, tal y como se puede apreciar en el Cuadro 50, todos los diámetros estudiados, estan originados por concentraciones muy superiores al valor del LMR.

Los límites de detección de las quinolonas que producen un halo inhibitorio de 22 mm (Cuadro 50) son inferiores a los obtenidos en el primer estudio, para el método microbiológico Eclipse "100ov" (4800 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ciprofloxacina, 3700 $\mu\text{g}/\text{kg}$ enrofloxacin, 90000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ flumequina y 9100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ norfloxacina), ya que el *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*, microorganismo que utiliza el citado método, no presenta buena sensibilidad frente a estos agentes quimioterapéuticos.

De las cuatro quinolonas estudiadas, solamente en dos de ellas se encuentra establecido el LMR-UE (enrofloxacin y flumequina) y una de ellas (flumequina) debe estar presente a niveles muy elevados para poder ser detectada por *E. coli* ATCC 11303 (Cuadro 50). Por ello, no se ha representado gráficamente en escala logarítmica las relaciones de las concentraciones para diferentes diámetros de inhibición relativos al LMR-UE.

Sin embargo, a partir de los resultados del Cuadro 50, se deduce que halos superiores a 22 mm resultan suficientes para detectar niveles de enrofloxacin y ciprofloxacina inferiores al LMR.

2.1.2.7. Detección de tetraciclinas mediante *Bacillus cereus* ATCC 11778 en la leche de oveja

Con el propósito de establecer una correlación entre las diferentes concentraciones de tetraciclinas en leche de oveja con los tamaños de los

halos de inhibición, se realizaron una serie de determinaciones, cuyos resultados se exponen en el Cuadro 51.

Respecto a la doxiciclina, hay que destacar que en la Legislación Comunitaria vigente no se ha fijado LMR alguno de este antimicrobiano en la leche. No obstante, debido a la baja sensibilidad que presenta el *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* presente como microorganismo de prueba en los métodos de inhibición microbiológica (BRT-AiM[®], Delvotest[®], Eclipse[®] “100ov”), se consideró interesante evaluar la respuesta del *Bacillus cereus* ATCC 11778 a fin de poder detectar residuos de este antimicrobiano en la leche de oveja.

Para las cuatro tetraciclinas se observó un incremento en la zona de inhibición a medida que aumentan sus concentraciones, con diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$; Cuadro 51).

Se puede deducir del Cuadro 51 que el *Bacillus cereus* ATCC 11778 posee buena sensibilidad para la detección de doxiciclina y clortetraciclina en leche de oveja, ya que concentraciones comprendidas entre 25 y 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de doxiciclina y próximas a los 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de clortetraciclina resultan suficientes para producir un halo inhibitorio cercano a 22 mm, mientras que la oxitetraciclina y tetraciclina deben hallarse en concentraciones comprendidas entre 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para obtener un diámetro del halo de 22 mm.

Al respecto, debe mencionarse que Nouws *et al.* (1999a,b) indican que un halo inhibitorio de 22 mm de diámetro corresponde a 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de doxiciclina o clortetraciclina y 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de oxitetraciclina o tetraciclina. Estas concentraciones son inferiores a las señaladas en el párrafo anterior cuando se utiliza leche de oveja y se puede atribuir, como se ha comentado para otros casos, a las diferencias en su composición físico-química en comparación con la leche de vaca.

También, Nouws *et al.* (1998) cuando utilizan *Bacillus cereus* ATCC 11778 como sensor biológico, observan halos de inhibición mayores para muestras que contienen 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de doxiciclina (32,3 mm) o clortetraciclina (29,9 mm), que en muestras enriquecidas con 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de oxitetraciclina (22,2 mm) o tetraciclina (22,6 mm), poniendo de manifiesto la mayor sensibilidad de este microorganismo para detectar residuos de doxiciclina y clortetraciclina en leche que el resto de tetraciclinas.

Respecto a la repetibilidad de las determinaciones, Brady y Katz (1987) en un estudio sobre un sistema microbiológico de difusión en placa, obtienen coeficientes de variación comprendidos entre 2,72-4,42% para la clortetraciclina y 3,31-6,04% para la oxitetraciclina analizados con *Bacillus cereus* ATCC 11778, valores superiores a los presentados en el Cuadro 51 que se encuentran comprendidos entre 0,71-2,19% para las cuatro tetraciclinas estudiadas.

Cuadro 51. Efecto de la concentración de tetraciclinas en la leche de oveja sobre el diámetro de la zona de inhibición del *Bacillus cereus* ATCC 11778

Tetraciclinas	Concentración (µg/kg)	n	Media	D.E.	Mínimo (mm)	Máximo (mm)	C.V. (%)
Clortetraciclina	25	9	16,64 _a	0,32	16,97	17,36	1,89
	50	9	22,26 _b	0,42	21,73	23,12	1,89
	100	36	26,24 _c	0,29	25,63	27,00	1,11
	200	9	29,53 _d	0,49	28,85	30,59	1,66
	400	9	32,46 _e	0,44	31,61	33,02	1,36
Doxiciclina	25	9	20,81 _a	0,46	19,91	21,83	2,19
	50	9	24,02 _b	0,33	23,56	24,56	1,37
	100	36	27,09 _c	0,34	26,30	27,99	1,26
	200	9	30,23 _d	0,34	29,53	30,82	1,12
	400	9	33,27 _e	0,29	32,58	33,59	0,87
Oxitetraciclina	100	9	18,71 _a	0,33	17,92	19,50	1,78
	200	9	23,40 _b	0,32	22,87	23,97	1,37
	400	36	27,69 _c	0,28	27,03	28,48	1,01
	800	9	30,79 _d	0,35	30,26	31,40	1,14
	1600	9	33,64 _e	0,24	33,36	34,12	0,71
Tetraciclina	100	9	17,79 _a	0,27	16,86	18,26	1,54
	200	9	22,96 _b	0,31	22,31	23,42	1,35
	400	36	27,17 _c	0,31	26,41	27,85	1,14
	800	9	30,55 _d	0,51	29,79	31,52	1,67
	1600	9	32,92 _e	0,29	32,27	33,27	0,88

n: Número de determinaciones; D.E.: Desviación estándar; C.V.: Coeficiente de variación; a,b,c,d,e: Diferentes subíndices en una misma columna señalan diferencias significativas a $p < 0,05$

Calderón *et al.* (1994) en un trabajo realizado para detectar antimicrobianos en carne, obtienen coeficientes de variación comprendidos entre el 2,20 % (placa simplificada con 6 perforaciones) y el 4,73 % (placas cuadradas con 36 muestras) para residuos de tetraciclinas analizados mediante el mismo microorganismo de prueba que en el presente estudio. Hay que destacar que dichos autores logran mejores valores, con coeficientes de variaciones más bajos cuando utilizan placas simplificadas con 6 perforaciones en comparación con las placas cuadradas con 36 perforaciones.

También en otro estudio, donde se comparan diferentes métodos de medida de la zona de inhibición, Calderón *et al.* (1998) observan, para una concentración de 400 µg/kg de tetraciclina, un coeficiente de variación de 3,05 % cuando utilizan un calibre electrónico y 5,31% al emplear el equipo "Reader

device”, resultando diferentes desde el punto de vista estadístico a un nivel de $p < 0,05$. Estos valores, que indican la repetibilidad del trabajo, son superiores a los calculados en el presente experimento.

La relación entre los logaritmos de las concentraciones de tetraciclinas y los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento del *Bacillus cereus* ATCC 11778, así como las rectas de regresión construidas y sus ecuaciones correspondientes se muestran en la Figura 41. Se puede observar que *Bacillus cereus* ATCC 11778 posee una sensibilidad semejante para las cuatro tetraciclinas ensayadas, ya que similares incrementos en sus concentraciones se corresponden con aumentos semejantes en los diámetros inhibitorios.

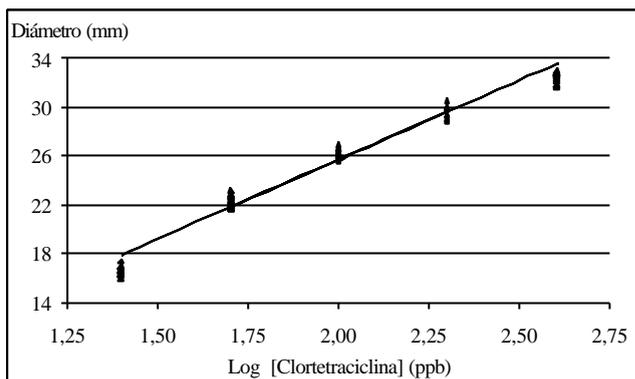
Los coeficientes de correlación fueron elevados para las cuatro tetraciclinas (superiores a 0,98), correspondiendo la menor correlación a la clortetraciclina por haber presentado mayores desviaciones estándar que el resto de las tetraciclinas (Figura 41). También se aprecia en la Figura que la doxiciclina posee el menor valor del coeficiente β_1 o pendiente de la recta.

Por su parte, el Cuadro 52 resume las concentraciones que producen halos inhibitorios de 18 mm, 20 mm y 22 mm de diámetro. Como se puede apreciar en dicho Cuadro para un diámetro de la zona de inhibición de 20 mm (aumento del radio de 2 mm), se obtienen los valores de concentración de tetraciclinas, más próximos a los LMR-UE. Teniendo en cuenta que es en el caso de la oxitetraciclina donde se acerca más al valor del LMR ($C_{20mm}=107$). Para la clortetraciclina se obtuvo un valor inferior al LMR ($C_{20mm}=36$) y para la tetraciclina ligeramente superior ($C_{20mm}=120$).

Cuadro 52. Concentraciones de tetraciclinas correspondientes a diferentes diámetros (18, 20 y 22 mm) de la zona de inhibición en leche de oveja

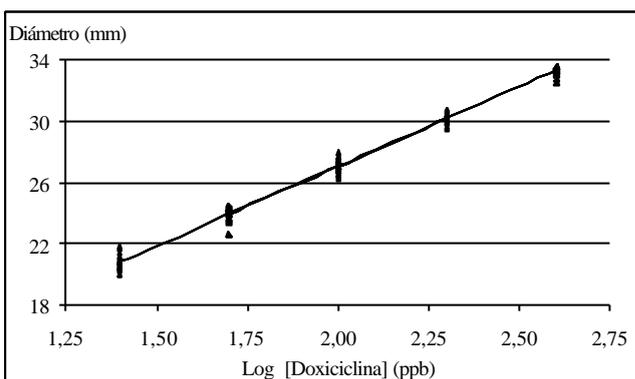
Tetraciclinas	Concentraciones ($\mu\text{g}/\text{kg}$)			LMRs-UE	
	C_{18mm}	C_{20mm}	C_{22mm}	$\mu\text{g}/\text{kg}$	Especie
Clortetraciclina	25	36	52	100	Todas
Doxiciclina	13	21	33	-	-
Oxitetraciclina	74	107	154	100	Todas
Tetraciclina	84	120	173	100	Todas

C_{18mm} , C_{20mm} y C_{22mm} : Concentraciones ($\mu\text{g}/\text{kg}$) correspondientes a diámetros de 18, 20 y 22 mm



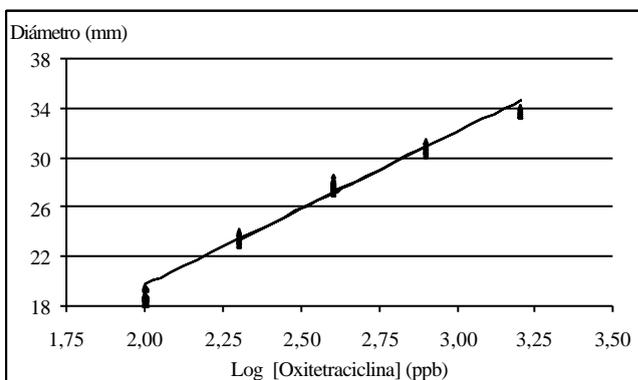
$$D = -0,20 + 12,96 \log[\text{Clortetraciclina}]$$

$$R = 0,9833$$



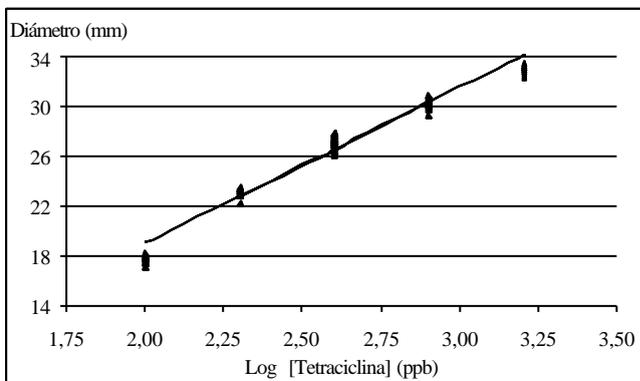
$$D = 6,24 + 10,41 \log[\text{Doxiciclina}]$$

$$R = 0,9938$$



$$D = -5,24 + 12,44 \log[\text{Oxitetraciclina}]$$

$$R = 0,9859$$



$$D = -6,32 + 12,65 \log[\text{Tetraciclina}]$$

$$R = 0,9809$$

Figura 41. Relación entre la concentración de quinolonas ($\mu\text{g}/\text{kg}$) en leche de oveja y el diámetro de la zona de inhibición (mm) de *Bacillus cereus* ATCC 11778

Para el caso de las tetraciclinas, cuando se realiza la comparación de los límites de detección del *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* presente en los métodos BRT-AiM[®] (390 µg/kg de doxiciclina, 5500 µg/kg de oxitetraciclina y 6200 µg/kg de tetraciclina) y Delvotest[®] (290 µg/kg de doxiciclina, 420 µg/kg de oxitetraciclina y 450 µg/kg de tetraciclina) señalados por Althaus *et al.* (2003b) y Molina *et al.* (2003b) para la leche de oveja, así como con los del Eclipse[®] “100ov” obtenidos de modo fotométrico, en el primer estudio (1500 µg/kg clortetraciclina, 230 µg/kg de doxiciclina, 500 µg/kg de oxitetraciclina y 460 µg/kg de tetraciclina), con los límites de detección del *Bacillus cereus* ATCC 11778 del Cuadro 52 (25 µg/kg clortetraciclina, 13 µg/kg de doxiciclina, 74 µg/kg de oxitetraciclina y 84 µg/kg de tetraciclina), resulta evidente que este microorganismo es mucho más específico y presenta mayor sensibilidad para detectar residuos de tetraciclinas en la leche que el utilizado en los métodos microbiológicos comercializados para la detección de inhibidores.

Por ello, Surhen y Heeschen (1993) al utilizar el *Bacillus cereus* var. *mycoides* ATCC 9634 para la detección de tetraciclinas en muestras de leche de vaca calculan límites de detección bajos (50 µg/kg de tetraciclina, 10 µg/kg de clortetraciclina, 50 µg/kg de oxitetraciclina y 30 µg/kg de doxiciclina). Respecto a los límites de detección del *Bacillus cereus* ATCC 11778, hay que indicar que Tsai y Kondo (2001) obtienen un incremento en el radio del halo de inhibición de 2 mm para concentraciones de 780 µg/kg de oxitetraciclina y 200 µg/kg de clortetraciclina que resultan muy superiores a las ensayadas con la leche de oveja.

No obstante, las concentraciones de tetraciclinas presentes en leche de oveja necesarias para producir un diámetro de aproximadamente 22 mm son más bajas a las que se pueden detectar mediante los métodos de inhibición microbiológica BRT-AiM[®] (Molina *et al.*, 2003b) y Delvotest[®] (Althaus *et al.*, 2003b), así como con el Eclipse[®] “100ov” (resultados del primer estudio) y resultan próximas a los LMRs establecidos por la Unión Europea.

En un estudio realizado por Calderón *et al.* (1994) sobre detección de tetraciclinas en extracto de carne, empleando *Bacillus cereus* ATCC 11778, se alcanza 120 µg/kg de tetraciclina, tanto en el caso en el que emplean placas cuadradas con 36 muestras como cuando utiliza placas redondas de 6 muestras.

Koenen-Dierick *et al.* (1995), cuando utilizan *Bacillus subtilis* BGA para detectar antimicrobianos en carne, calculan límites de detección, para el caso de la oxitetraciclina de 100 µg/kg, alcanzando halos de inhibición en torno a los 22 mm. Estos resultados se aproximan bastante a los obtenidos por Nouws *et al.* (1998) en leche de vaca.

Sin embargo, Myllyniemi *et al.* (2001) usando un método microbiológico formado por 6 placas con una matriz cárnica, establecen un límite de detección de 300 µg/kg para oxitetraciclina con *Bacillus cereus* ATCC 11778, que resulta muy superior al obtenido con el SMMP aplicado a la leche de oveja.

La representación de los logaritmos de los cocientes entre las concentraciones que producen halos de inhibición fijos y los LMR-UE para las tres tetraciclinas cuyos LMR han sido fijados, se muestra en la Figura 42.

Se puede apreciar que concentraciones de oxitetraciclina en leche cercanas a 0,5 veces LMR resultan suficientes para producir un halo de inhibición de 18 mm (resultados "falsos violativos"). Por el contrario, halos de inhibición próximos a los 22 mm ponen de manifiesto concentraciones de aproximadamente 2 veces LMR de tetraciclina u oxitetraciclina. La clortetraciclina, siempre será detectada a niveles inferiores al LMR, pudiendo dar lugar a penalizaciones injustas.

De todo lo expuesto se puede sintetizar que un diámetro de inhibición de 20 mm en la placa de *Bacillus cereus* ATCC 11778 resulta apropiado para establecer el punto a partir del cual las muestras de leche deberían someterse a un análisis posterior de cromatografía en fase líquida HPLC o algún método de tipo enzimático específico para la detección de residuos de tetraciclinas

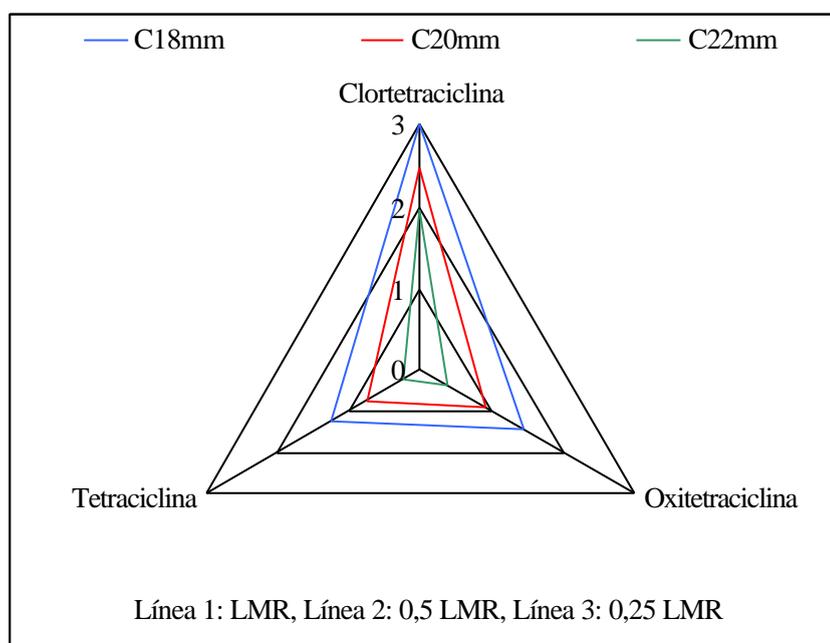


Figura 42. Comparación de las concentraciones que producen diferentes diámetros de inhibición con los LMR de tetraciclinas en leche de oveja

2.1.2.8. Detección de sulfonamidas mediante *Bacillus subtilis* BGA en la leche de oveja

Los valores de los diámetros de las zonas de inhibición para diferentes concentraciones de las cuatro sulfonamidas ensayadas se presentan en el Cuadro 53.

Tanto la sulfadimetoxina, como sulfatiazol producen un diámetro de inhibición superior a 18 mm cuando se utilizan concentraciones equivalentes al

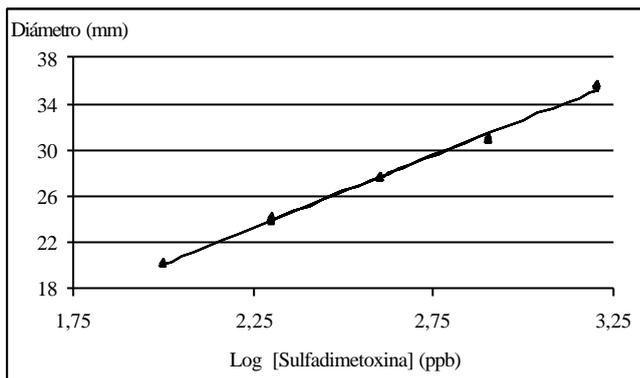
LMR-UE (100 µg/kg). El aumento en la concentración de sulfonamida se refleja en un incremento en el tamaño del halo de inhibición, con desviaciones estándar muy similares para las distintas concentraciones ensayadas. Este hecho va acompañado de bajos valores de los coeficientes de variación (Cuadro 53), que en ningún caso superaron el 1,0 %.

Cuadro 53. Efecto de la concentración de sulfonamidas en la leche de oveja sobre el diámetro del halo de inhibición del *Bacillus subtilis* BGA

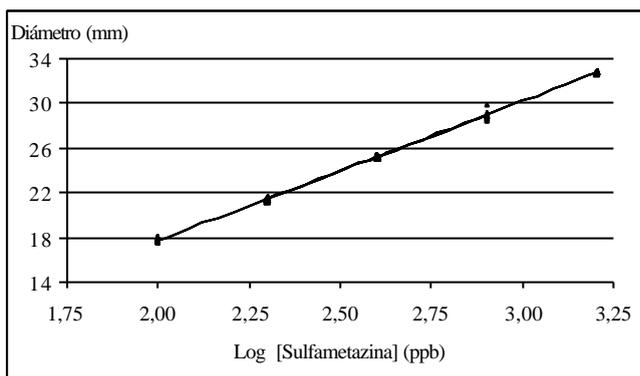
Sulfonamidas	Concentración (µg/kg)	n	Media	D.E.	Mínimo (mm)	Máximo (mm)	C.V. (%)
Sulfadimetoxina	100	9	20,22 _a	0,05	20,12	20,33	0,25
	200	9	24,10 _b	0,11	23,85	24,24	0,46
	400	36	27,64 _c	0,04	27,54	27,74	0,14
	800	9	30,96 _d	0,08	30,85	31,13	0,26
	1600	9	35,65 _e	0,07	35,56	35,80	0,20
Sulfametazina	100	9	17,76 _a	0,15	17,50	17,98	0,84
	200	9	21,39 _b	0,09	21,20	21,54	0,42
	400	36	25,18 _c	0,04	25,08	25,31	0,16
	800	9	28,84 _d	0,28	28,43	29,79	0,97
	1600	9	32,75 _e	0,05	32,66	32,84	0,15
Sulfanilamida	200	9	18,37 _a	0,05	18,30	18,48	0,27
	400	9	22,11 _b	0,07	21,95	22,24	0,32
	800	36	25,74 _c	0,03	25,66	25,81	0,12
	1600	9	30,13 _d	0,08	30,02	30,29	0,27
	3200	9	35,23 _e	0,04	35,16	35,30	0,11
Sulfatiazol	100	9	19,42 _a	0,27	18,40	19,60	1,39
	200	9	22,88 _b	0,06	22,80	23,03	0,26
	400	36	28,45 _c	0,05	28,35	28,59	0,18
	800	9	32,00 _d	0,08	31,90	32,19	0,25
	1600	9	35,52 _e	0,08	35,41	35,70	0,23

n: Número de determinaciones; D.E.: Desviación estándar; C.V.: Coeficiente de variación; a,b,c,d,e: Diferentes subíndices en una misma columna señalan diferencias significativas a $p < 0,05$

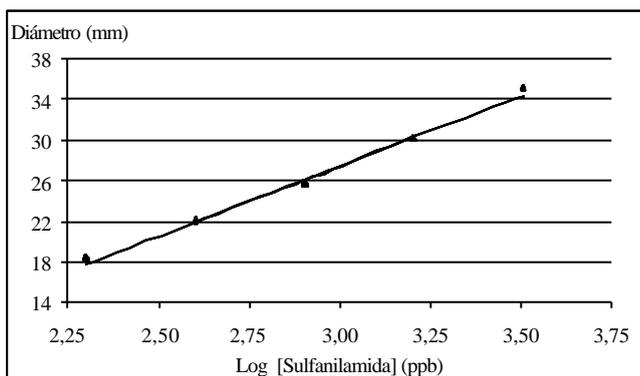
Los coeficientes que relacionan los diámetros de los halos con los logaritmos de las concentraciones de sulfonamidas, calculados mediante la aplicación del modelo de regresión lineal se resumen en la Figura 43. Se debe señalar que *Bacillus subtilis* BGA posee una sensibilidad similar para las cuatro



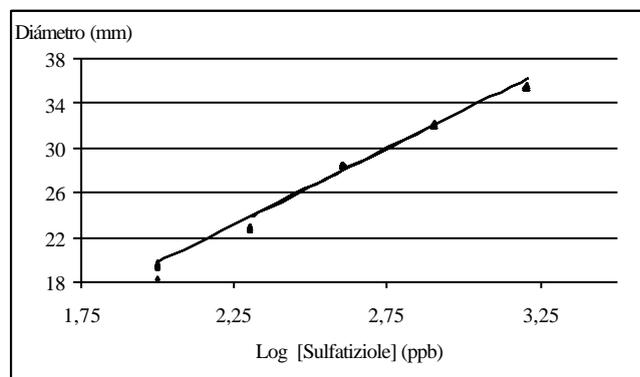
$D = -4,92 + 12,53 \log[\text{Sulfadimetoxina}]$
 $R = 0,9982$



$D = -7,16 + 12,43 \log[\text{Sulfametazina}]$
 $R = 0,9995$



$D = -14,17 + 13,87 \log[\text{Sulfanilamida}]$
 $R = 0,9955$



$D = -7,77 + 13,73 \log[\text{Sulfatiazol}]$
 $R = 0,9927$

Figura 43. Relación entre la concentración de sulfonamidas (µg/kg) en leche de oveja y el diámetro de la zona de inhibición (mm) de *Bacillus subtilis* BGA

sulfonamidas estudiadas, ya que los valores de los coeficientes “ β_1 ” (pendientes de las rectas de regresión) son semejantes. Los coeficientes de regresión fueron elevados (0,9995).

En el Cuadro 54 se presentan las concentraciones que producen diámetros de inhibición de 18, 20 y 22 mm de diámetro junto a los LMRs-UE. Hay que destacar que las concentraciones que producen halos inhibitorios de 20 mm resultan próximas al LMR-UE para la sulfadimetoxina y sulfatiazol. Sin embargo, para la sulfametazina la zona de inhibición de 18 mm se acerca más a las concentraciones del LMR. Mientras que la sulfanilamida requiere de concentraciones próximas a 2 veces el LMR para producir un halo de 18 mm.

Cuadro 54. Concentraciones de sulfonamidas correspondientes a diferentes diámetros (18, 20 y 22 mm) de la zona de inhibición en leche de oveja

Sulfonamidas	Concentraciones (μ /kg)			LMRs-UE	
	C _{18mm}	C _{20mm}	C _{22mm}	μ /kg	Especie
Sulfadimetoxina	67	97	141	100	Todas
Sulfametazina	106	153	222	100	Todas
Sulfanilamida	209	291	405	100	Todas
Sulfatiazol	75	105	148	100	Todas

C_{18mm}, C_{20mm} y C_{22mm}: Concentraciones (μ /kg) correspondientes a diámetros de 18, 20 y 22 mm respectivamente

Cuando la placa que contiene esporas de *Bacillus subtilis* BGA se utiliza con muestras de leche enriquecidas con sulfonamidas, Nouws *et al.* (1999a,b) observan un diámetro de inhibición de 20 mm para 50 μ g/kg de sulfadimetoxina, 75 μ g/kg de sulfametazina o 200 μ g/kg de sulfanilamida, valores inferiores a los 97 μ g/kg, 153 μ g/kg y 291 μ g/kg calculadas para un diámetro de 20 mm en el caso de la leche de oveja (Cuadro 54).

Tsai y Kondo (2001) emplean concentraciones de sulfonamidas, en leche de vaca, mayores a las calculadas en este trabajo para producir un incremento en el radio de 2,0 mm en el crecimiento de *Bacillus subtilis* ATCC-6633 (780 μ g/kg de sulfadimetoxina, 12500 μ g/kg de sulfametazina y 6250 μ g/kg de sulfatiazol).

Aureli *et al.* (1996) cuando emplean *Bacillus subtilis* ATCC 6633, llegan a detectar 100 μ g/kg de sulfadiazina en leche. Dichos autores establecen que la adición de ácido paraaminobenzoico disminuye el límite de detección hasta 75 μ g/kg.

Comparando los límites de detección del *Bacillus subtilis* BGA (Cuadro 54) con los límites de detección del *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* presente en el método Eclipse[®] "100ov", empleado en el primer estudio, (157

$\mu\text{g}/\text{kg}$ sulfadimetoxina, $405 \mu\text{g}/\text{kg}$ sulfametazina, $218 \mu\text{g}/\text{kg}$ sulfanilamida y $237 \mu\text{g}/\text{kg}$ sulfatiazol) resulta evidente la mayor sensibilidad del primer microorganismo para la detección de residuos de sulfonamidas en leche de oveja.

Debido a que algunos de los diámetros de las zonas de inhibición de la sulfonamidas resultaron similares al LMR establecido por la UE ($100 \mu\text{g}/\text{kg}$) se ha utilizado una escala logarítmica en base dos para representar las relaciones entre las concentraciones que producen halos de inhibición de 18, 20 y 22 mm con los LMR (Figura 44).

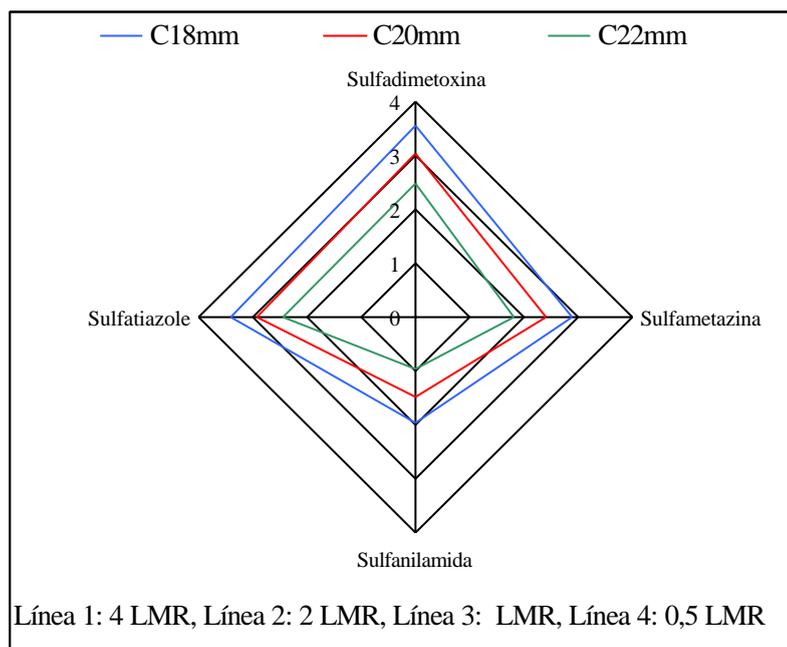


Figura 44. Comparación de las concentraciones que producen diferentes diámetros de inhibición con los LMR de sulfonamidas en leche de oveja

Se puede apreciar que concentraciones inferiores al LMR de sulfatiazol, sulfametazina y sulfadimetoxina producen halos de inhibición de 18 mm, pudiendo llevar a resultados "falsos violativos", mientras que concentraciones superiores a LMR de las cuatro sulfonamidas producen halos inhibitorios de 22 mm.

Todo ello surge que un diámetro de 20 mm resulta ser el más apropiado para establecer un punto de corte a partir del cual las muestras de leche deberían someterse a un análisis posterior de cromatografía HPLC u otra técnica específica (Elisa, receptores, etc.) para estos antimicrobianos en leche.

2.2. ESPECIFICIDAD DEL SMMP EN LECHE DE OVEJA

2.2.1. Selectividad del SMMP

Los resultados “falsos positivos” se consideran aquellos resultados calificados como positivos que se obtienen al analizar, con un método determinado, muestras de leche que no contienen residuos de sustancias antimicrobianas.

En este experimento se evaluaron por duplicado 100 muestras de leche procedentes de animales no tratados con ningún tipo de sustancia medicamentosa y, que además fueron calentadas previamente a su análisis siguiendo las indicaciones del método para la leche de vaca (Nouws *et al.*, 1999a,b) para así evitar la influencia de los inhibidores naturales.

Para la clasificación de resultados, se consideraron resultados “negativos” cuando el diámetro de la zona de inhibición resultaba inferior a 16 mm (incremento del radio menor de 1 mm), resultados “dudosos” cuando los diámetros se encontraban comprendidos entre 16 y 18 mm (incremento del radio entre 1 y 2 mm) y resultados “positivos” cuando se produjeron incrementos apreciables en los diámetros de las zonas de inhibición iguales o superiores a 18 mm (incremento del radio de 2 mm).

La selectividad se calculó a partir del concepto expresado por Sischo y Burns (1993) que la definen como: “el cociente entre el número de muestras negativas encontradas en un determinado método y el total de muestras analizadas”.

Los resultados obtenidos de todas las muestras ensayadas, en cada una de las placas específicas para los diferentes grupos de antimicrobianos, se señalan en el Cuadro 55.

Cuadro 55. Selectividad del SMMP en leche de oveja

	Diámetro zona Inhibición (mm)			Selectividad (%)
	< 16	16-18	>18	
	Nº de casos (n)			
<i>B. stearothermophilus</i>	99	1	0	99
<i>B. subtilis</i> pH 8,0	100	0	0	100
<i>M. luteus</i>	100	0	0	100
<i>E. coli</i>	98	2	0	98
<i>B. cereus</i>	99	1	0	99
<i>B. subtilis</i> pH 7,0	100	0	0	100

Tal y como queda reflejado en el Cuadro 55, únicamente se encontraron algunos resultados “dudosos” (diámetros 16-18 mm) en las placas correspondientes a betalactámicos, macrólidos y quinolonas, obteniendo un valor de selectividad del 99%, 98% y 99% respectivamente, mientras que en el

resto de las placas estudiadas los valores de selectividad fueron muy buenos (100%).

A partir de los resultados obtenidos (Cuadro 55), se puede deducir que cuando se emplea leche de oveja calentada a $80 \pm 1^\circ\text{C}$, la selectividad para todas las placas resulta muy adecuada.

Por otra parte, Molina *et al.* (2003a) señalan en la evaluación para la leche de oveja de los métodos microbiológicos BRT AiM[®] y Delvotest[®], que emplea *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C953, que la relación de selectividad fue de un 96,3% y 97,7% respectivamente para la leche sin tratamiento térmico. Hay que señalar que este microorganismo es el mismo que el empleado en la placa destinada a residuos de antibióticos betalactámicos del SMMP.

Estos mismos autores realizan un estudio, llevando a cabo un calentamiento de la leche previo al análisis de la misma, para evitar la interferencia en los resultados, debido a la presencia de inhibidores naturales. Los resultados de selectividad que obtuvieron fueron superiores a los de las muestras sin calentar 99,0% para el BRT AiM[®] y un 98,7% con el Delvotest[®] y resultan comparables con los obtenidos para el SMMP.

A su vez, en el primer estudio realizado en este trabajo al emplear el método de cribado Eclipse[®] “100ov”, cuyo microorganismo es también el *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*, los resultados obtenidos muestran también una selectividad muy elevada del 99% que disminuye cuando las muestras contienen azidol (91%).

2.2.2. Especificidad cruzada

El estudio de la especificidad cruzada está destinado a conocer las posibles interferencias que cada una de las placas específicas, para la detección de un grupo de antimicrobianos, puede tener con el resto de sustancias pertenecientes a otros grupos.

En este estudio, se ensayaron en primer lugar concentraciones equivalentes a 1, 2,5; 5; 10; 20 y 40 veces la concentración que había presentado un diámetro de 18 mm (C_{18}) en su respectiva placa. Se consideraron solamente aquellos resultados que provocaban zonas de inhibición superiores al nivel de decisión correspondiente a cada placa, definidos en el experimento anterior, tal y como se expone en el apartado 2.1.2. de Resultados y Discusión.

Los resultados encontrados en el estudio de especificidad cruzada producidos por la presencia de aminoglucósidos, macrólidos, quinolonas, tetraciclinas y sulfonamidas en leche de oveja cuando se utiliza la placa de *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*, destinada a la detección de antibióticos betalactámicos, se presentan en el Cuadro 56. En este cuadro, aparecen señalados con letra “negrita” los diámetros superiores al nivel de decisión propuesto para esta placa (20 mm).

Cuadro 56. Diámetros de inhibición correspondientes a diferentes agentes antimicrobianos ensayados en la placa de *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* (betalactámicos: nivel de decisión 20 mm)

Antimicrobiano (C ₁₈)*	Concentraciones (mg/kg)					
	1 x C ₁₈	2,5 x C ₁₈	5 x C ₁₈	10 x C ₁₈	20 x C ₁₈	40 x C ₁₈
Aminoglucósidos						
Gentamicina (20)	18,92	19,07	21,16	22,65	23,71	26,37
Kanamicina (160)	16,73	16,92	16,86	21,35	23,96	26,73
Neomicina (60)	17,26	17,49	18,68	20,54	22,64	23,68
Estreptomina (150)	16,84	17,06	17,55	24,00	25,35	26,81
Macrólidos						
Eritromicina (20)	17,10	17,21	17,70	21,71	25,13	26,75
Espiramicina (100)	17,07	17,34	17,35	22,37	22,90	24,73
Tilosina (300)	25,93	28,85	30,61	32,28	34,06	37,27
Quinolonas						
Ciprofloxacina (15)	nd	nd	nd	18,89	18,95	18,80
Enrofloxacin (30)	nd	nd	nd	18,59	19,18	24,02
Flumequina (550)	nd	nd	nd	18,72	18,51	18,49
Norfloxacin (60)	nd	nd	nd	18,65	18,52	18,62
Tetraciclinas						
Clortetracilina (25)	nd	nd	nd	18,78	19,40	19,67
Doxiciclina (15)	nd	nd	17,50	19,60	19,17	19,71
Oxitetracilina (75)	17,49	17,38	17,27	19,11	20,80	21,89
Tetraciclina (85)	16,90	17,03	19,26	21,50	24,25	26,77
Sulfonamidas						
Sulfadimetoxina (70)	nd	nd	nd	18,74	18,73	19,15
Sulfametazina (100)	nd	nd	nd	18,82	18,92	19,09
Sulfanilamida (200)	nd	nd	nd	18,59	18,71	18,82
Sulfatiazol (75)	nd	nd	nd	18,68	18,95	19,55

* C₁₈= Concentraciones (µg/kg), que corresponden a un diámetro de 18 mm en su respectiva placa. Con negrita se indican los diámetros superiores al nivel de decisión de la placa; nd= no detectable

En el Cuadro 56 se observa que los antibióticos aminoglucósidos y macrólidos presentan interferencias a elevadas concentraciones (10 x C₁₈), a excepción de la gentamicina (5 x C₁₈) y la tilosina (1 x C₁₈) que presentaron interferencias a menores concentraciones.

Se debe destacar la inhibición que produce la tilosina en la placa de *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* ya que todas las concentraciones

ensayadas producen un diámetro de inhibición superior a 24 mm. De hecho, una concentración de 300 µg/kg produce en esta placa un diámetro de 25,93 mm, mientras que en la placa de *Micrococcus Luteus*, específico del grupo de aminoglucósidos, produce un halo de inhibición tan solo de 18 mm.

Este hecho revela la mayor sensibilidad del primer microorganismo en comparación con el segundo, pese a no ser el específico para la detección de macrólidos. Esta notoria capacidad del *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* en detectar residuos de tilosina ha sido señalada por otros autores, también en leche de oveja, en los métodos de cribado que utilizan el mismo microorganismo de prueba, como son el Delvotest[®] (Althaus *et al.*, 2003b), BRT-AiM[®] (Molina *et al.*, 2003b) y Eclipse[®] “100ov” (Montero *et al.*, 2004).

Respecto a las quinolonas, las interferencias se producen a concentraciones equivalentes a 10 veces la C₁₈ (10 x C₁₈) y siempre se presentan diámetros de inhibición inferiores a 20 mm, (que se considera el diámetro establecido como nivel de decisión) excepto en el caso de la enrofloxacina que alcanza valores de 24,02 mm (40 x C₁₈).

En el caso de las tetraciclinas la clortetraciclina y la doxiciclina interfieren a concentraciones equivalentes a 10 veces la C₁₈, pero siempre con valores inferiores al nivel de decisión de esta placa. Mientras que la oxitetraciclina y la tetraciclina lo hacen con valores superiores a 20 mm a concentraciones de 10 veces la C₁₈ (oxitetraciclina) y 40 veces la C₁₈ (tetraciclina).

Sin embargo el grupo de las sulfonamidas presenta interferencias escasas, siendo éstas a concentraciones de 10 veces la C₁₈ y con valores de diámetros de inhibición inferiores a 20 mm (nivel de decisión de la placa de betalactámicos).

La interferencia ocasionada por una gran cantidad de agentes antimicrobianos explica la gran difusión que encuentra este microorganismo de prueba en la mayoría de los métodos de cribado o “screening” más difundidos a nivel mundial, para detectar (aunque sea a elevadas concentraciones) la mayor cantidad de residuos.

En cuanto a los principales resultados encontrados en el estudio de especificidad cruzada en leche de oveja cuando se utiliza la placa de *Bacillus subtilis* BGA, empleada en la detección de aminoglucósidos, se resumen en el Cuadro 57.

De todos los betalactámicos ensayados, solamente se observaron diámetros superiores a 18 mm, con 120 µg/kg de amoxicilina (40 x C₁₈) y 80 µg/kg de penicilina (40 x C₁₈). Pero los diámetros obtenidos fueron inferiores a 20 mm (nivel de decisión en esta placa).

En el caso de los macrólidos se presentan mayores interferencias, ya que concentraciones equivalentes a 5 x C₁₈ de eritromicina y tilosina resultan suficientes para producir unas zonas de inhibición, superiores a 20 mm, pudiendo dar lugar a resultados “falsos positivos”.

También los residuos de quinolonas producen interferencias en esta placa, originando halos inhibitorios superiores a 20 mm (nivel de decisión) cuando están presentes niveles equivalentes a $20 \times C_{18}$.

A este respecto, Nouws *et al.* (1999a) señalan que la presencia de 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ tilosina en leche de vaca produce halos de inhibición superiores a los 25 mm de diámetro, mientras que 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de eritromicina o 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ espiramicina interfieren en esta placa ocasionando halos con diámetros superiores a los 22 mm. Para las quinolonas, solamente observan interferencias cuando se encuentran presentes 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de enrofloxacin.

Se debe mencionar que Schwaiger *et al.* (1996) utilizan *Bacillus subtilis* BGA como microorganismo de prueba para la detección de macrólidos, a excepción de la espiramicina, mediante el método semicuantitativo "TLC - Bioautographic" utilizado ampliamente en Austria.

Koenen-Dierick *et al.* (1995), a fin de detectar residuos de agentes antimicrobianos presentes en tejido de riñón y carne, diseñaron un método de inhibición microbiológico que utiliza una única placa con esporas de *Bacillus subtilis* BGA a pH 7,0. Dicho método permite, además de la detección de residuos específicos de aminoglicosidos, revelar la presencia de otros agentes antimicrobianos tales como betalactámicos (amoxicilina y bencilpenicilina), macrólidos (tilosina) y quinolonas (flumequina y enrofloxacin), poniendo de manifiesto la sensibilidad que posee este microorganismo de prueba con una gran parte de los antimicrobianos.

A su vez Choi *et al.* (1999) llevan a cabo un estudio comparativo para la detección de residuos de quinolonas en tejido animal utilizando tres cepas de *Escherichia coli* (ATCC 128, 10536 y 25922) y *Bacillus subtilis* ATCC 3491. Dichos autores, además de destacar la excelente sensibilidad de las tres variedades de *E. coli*, señalan que *B. subtilis* puede detectar 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de residuos de enrofloxacin, nivel similar a los 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ hallado en este trabajo.

La interferencia que producen los diferentes agentes antimicrobianos en la placa de *Micrococcus luteus* ATCC 9341, que se emplea para detección de residuos de antibióticos macrólidos, se presenta en el Cuadro 58.

Se puede observar que solamente los residuos de algunos antibióticos betalactámicos presentes en la leche de oveja producen halos de inhibición en esta placa, aunque deben estar presentes a concentraciones muy elevadas, comprendidas entre 10-40 veces la C_{18} , concretamente $10 \times C_{18}$ (penicilina "G" y oxacilina), $20 \times C_{18}$ (cefuroxime), y $40 \times C_{18}$ (cloxacilina y cefoperazone).

Resulta conveniente mencionar que Nouws *et al.* (1999a) también señalan halos de inhibición comprendidos entre los 16 y 22 mm para concentraciones de 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de penicilina o ampicilina en muestras de leche de vaca, similar a las señaladas en el Cuadro 58.

Cuadro 57. Diámetros de inhibición correspondientes a diferentes de agentes antimicrobianos ensayados en la placa de *Bacillus subtilis* BGA (aminoglucósidos: nivel de decisión 20 mm)

Antimicrobiano (C18)*	Concentraciones (mg/kg)					
	1 x C ₁₈	2,5 x C ₁₈	5 x C ₁₈	10 x C ₁₈	20 x C ₁₈	40 x C ₁₈
Betalactámicos						
Penicilina "G" (2)	nd	nd	nd	nd	17,20	18,93
Amoxicilina (3)	nd	nd	nd	nd	nd	18,14
Cloxacilina (30)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Oxacilina (10)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Cefadroxilo (50)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Cefalexina (75)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Cefoperazone (50)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Cefuroxime (50)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Macrólidos						
Eritromicina (20)	nd	17,32	22,01	24,77	28,15	31,71
Espiramicina (100)	nd	nd	nd	18,98	21,39	25,00
Tilosina (300)	nd	17,45	21,00	24,47	27,31	30,24
Quinolonas						
Ciprofloxacina (15)	nd	nd	nd	18,31	21,55	23,78
Enrofloxacin (30)	nd	nd	nd	17,80	26,00	31,42
Flumequina (550)	nd	nd	17,30	19,93	28,05	31,88
Norfloxacin (60)	nd	nd	nd	18,03	22,50	26,55
Tetraciclinas						
Clortetracilina (25)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Doxiciclina (15)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Oxitetracilina (75)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Tetraciclina (85)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Sulfonamidas						
Sulfadimetoxina (70)	nd	nd	nd	18,72	18,73	19,15
Sulfametazina (100)	nd	nd	nd	18,81	18,92	19,09
Sulfanilamida (200)	nd	nd	nd	18,63	18,90	18,83
Sulfatiazol (75)	nd	nd	nd	18,96	19,07	19,56

* C₁₈= Concentraciones (µg/kg) recomendadas, que corresponden a un diámetro de 18 mm en su respectiva placa. Con negrita se indican los diámetros superiores al nivel de decisión de la placa ; nd= no detectable

Cuadro 58. Diámetros de de inhibición correspondientes a diferentes agentes antimicrobianos ensayados en la placa de *Micrococcus luteus* ATCC 9341 (macrólidos: nivel de decisión 20 mm)

Antimicrobiano (C ₁₈)*	Concentraciones (mg/kg)					
	1 x C ₁₈	2,5 x C ₁₈	5 x C ₁₈	10 x C ₁₈	20 x C ₁₈	40 x C ₁₈
Betalactámicos						
Penicilina "G" (2)	nd	nd	19,30	24,10	28,19	31,12
Amoxicilina (3)	nd	nd	nd	18,96	24,77	34,59
Cloxacilina (30)	nd	nd	nd	nd	18,55	23,49
Oxacilina (10)	nd	nd	nd	20,13	27,31	32,14
Cefadroxil (50)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Cefalexina (75)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Cefoperazone (50)	nd	nd	nd	17,61	19,52	26,58
Cefuroxime (50)	nd	nd	nd	16,84	31,60	35,15
Aminoglucósidos						
Gentamicina (20)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Kanamicina (160)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Neomicina (160)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Estreptomina (150)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Quinolonas						
Ciprofloxacina (15)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Enrofloxacin (30)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Norfloxacin (60)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Flumequina (550)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Tetraciclinas						
Clortetracilina (25)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Doxiciclina (15)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Oxitetraciclina (75)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Tetraciclina (85)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Sulfonamidas						
Sulfadimetoxina (70)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Sulfametazina (100)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Sulfanilamida (200)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Sulfatiazol (75)	nd	nd	nd	nd	nd	nd

* C₁₈= Concentraciones (µg/kg) recomendadas, que corresponden a un diámetro de 18 mm en su respectiva placa. Con negrita se indican los diámetros superiores al nivel de decisión de la placa; nd= no detectable

Por otra parte, la inhibición de *Escherichia coli* ATCC 11303 producida por los diferentes agentes antimicrobianos, a excepción de las quinolonas para cuya detección se emplea este microorganismo, se resumen en el Cuadro 59.

De todos los betalactámicos ensayados, se debe destacar la interferencia del cefoperazone a partir de $2,5 \times C_{18}$ y en el caso de las tetraciclinas la de la oxitetraciclina y tetraciclina, que son capaces de inhibir el crecimiento de *E. coli* a elevadas concentraciones ($40 \times C_{18}$).

Hay que señalar que las cefalosporinas de tercera y cuarta generación tal como el cefoperazone, presentan acción antimicrobiana frente a los gérmenes gram negativos, como *E. coli* (Merck & CO, 2000), lo que explicaría su efecto inhibitorio a concentraciones de $125 \mu\text{g}/\text{kg}$ ($2,5 \times C_{18}$) en esta placa.

Los estudios de especificidad cruzada realizados por Nouws *et al.* (1999a,b) no señalan estas interferencias, pero si revelan halos de inhibición comprendidos entre los 16 y 22 mm para concentraciones de $500 \mu\text{g}/\text{kg}$ de trimetoprim y colistina, antimicrobianos que no se estudian en el presente trabajo.

Por otra parte en el Cuadro 60 se presentan los resultados del estudio de especificidad para la placa de *Bacillus cereus* ATCC 11778 empleada para los residuos de tetraciclinas.

Se han observado zonas de inhibición con diámetros superiores al nivel de decisión de la placa (20 mm) cuando las muestras de leche se encuentran fortificadas con espiramicina y tilosina ($20 \times C_{18}$) y flumequina ($10 \times C_{18}$) tal como se muestra en el Cuadro 60, mientras que el resto de antimicrobianos de los diferentes grupos ensayados no presentan zonas de inhibición y, por tanto, no interfieren con esta placa.

Respecto a la detección de tetraciclinas, Nouws *et al.* (1999a) presentan únicamente diámetros comprendidos entre los 16 y 22 mm cuando la eritromicina se halla presente en la leche de vaca a un nivel de $1000 \mu\text{g}/\text{kg}$ no encontrando ningún tipo de interferencia con los antimicrobianos comentados anteriormente.

Por último en el Cuadro 61 se presentan los resultados obtenidos cuando se estudia la especificidad cruzada de la placa de las sulfonamidas. Cabe destacar que en esta placa interfieren todos los antibióticos betalactámicos a excepción de la amoxicilina, a niveles de $10 \times C_{18}$ (penicilina "G" y cefuroxime), $20 \times C_{18}$ (cloxacilina, oxacilina, cefadroxil, cefalexina, y cefoperazone). Sin embargo, Nouws *et al.* (1999a) señala halos de 16-22 mm para la penicila G ($20 \mu\text{g}/\text{kg}$), la cloxacilina y cefalexina ($100 \mu\text{g}/\text{kg}$).

En el grupo de los aminoglucósidos aparecen halos de inhibición siempre a concentraciones elevadas ($40 \times C_{18}$), a excepción de la kanamicina que a concentraciones de $10 \times C_{18}$ ya se encuentran zonas de inhibición.

Cuadro 59. Diámetros de inhibición correspondientes a diferentes agentes antimicrobianos ensayados en la placa de *Escherichia coli* ATCC 11303 (quinolonas: nivel de decisión 22mm)

Antimicrobiano (C ₁₈)*	Concentraciones (mg/kg)					
	1 x C ₁₈	2,5 x C ₁₈	5 x C ₁₈	10 x C ₁₈	20 x C ₁₈	40 x C ₁₈
Betalactámicos						
Penicilina "G" (2)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Amoxicilina (3)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Cloxacilina (30)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Oxacilina (10)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Cefadroxil (50)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Cefalexina (75)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Cefoperazone (50)	18,43	24,83	26,44	28,04	38,15	38,07
Cefuroxime (50)	nd	nd	nd	nd	18,03	20,83
Aminoglucósidos						
Gentamicina (20)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Kanamicina (160)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Neomicina (60)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Estreptomycin (150)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Macrólidos						
Eritromicina (20)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Espiramicina (100)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Tilosina (300)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Tetraciclinas						
Clortetracilina (25)	nd	nd	nd	nd	nd	21,23
Doxiciclina (15)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Oxitetraciclina (75)	nd	nd	nd	nd	18,08	27,00
Tetraciclina (85)	nd	nd	nd	nd	21,78	23,20
Sulfonamidas						
Sulfadimetoxina (70)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Sulfametazina (100)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Sulfanilamida (200)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Sulfatiazol (75)	nd	nd	nd	nd	nd	nd

* C₁₈= Concentraciones (µg/kg) recomendadas, que corresponden a un diámetro de 18 mm en su respectiva placa. Con negrita se indican los diámetros superiores al nivel de decisión de la placa; nd= no detectable

Cuadro 60. Diámetros de inhibición correspondientes a diferentes agentes antimicrobianos ensayados en la placa de *Bacillus cereus* ATCC 11778 (tetraciclinas: nivel de decisión 20 mm)

Antimicrobiano (C ₁₈)*	Concentraciones (mg/kg)					
	1 x C ₁₈	2,5 x C ₁₈	5 x C ₁₈	10 x C ₁₈	20 x C ₁₈	40 x C ₁₈
Betalactámicos						
Penicilina "G" (2)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Amoxicilina (3)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Cloxacilina (30)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Oxacilina (10)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Cefadroxil (50)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Cefalexina (75)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Cefoperazone (50)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Cefuroxime (50)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Aminoglucósidos						
Gentamicina (20)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Kanamicina (160)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Neomicina (60)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Estreptomycin (150)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Macrólidos						
Eritromicina (20)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Espiramicina (100)	nd	nd	nd	16,67	20,25	24,17
Tilosina (300)	nd	nd	nd	17,60	20,17	22,70
Quinolonas						
Ciprofloxacina (15)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Enrofloxacin (30)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Flumequina (550)	nd	nd	19,90	22,03	23,87	25,68
Norfloxacin (60)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Sulfonamidas						
Sulfadimetoxina (70)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Sulfametazina (100)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Sulfanilamida (200)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Sulfatiazol (75)	nd	nd	nd	nd	nd	nd

* C₁₈= Concentraciones (µg/kg) recomendadas, que corresponden a un diámetro de 18 mm en su respectiva placa. Con negrita se indican los diámetros superiores al nivel de decisión de la placa; nd= no detectable

Cuadro 61. Diámetros de inhibición correspondientes a diferentes agentes antimicrobianos ensayados en la placa de *Bacillus subtilis* BGA pH 7,0 (sulfonamidas: nivel de decisión 20 mm)

Antimicrobiano (C18)*	Concentraciones (mg/kg)					
	1 x C ₁₈	2,5 x C ₁₈	5 x C ₁₈	10 x C ₁₈	20 x C ₁₈	40 x C ₁₈
Betalactámicos						
Penicilina "G" (2)	nd	nd	nd	24,42	26,35	29,93
Amoxicilina (3)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Cloxacilina (30)	nd	nd	nd	nd	24,13	31,00
Oxacilina (10)	nd	nd	nd	nd	20,33	21,37
Cefadroxil (50)	nd	nd	nd	nd	20,21	22,32
Cefalexina (75)	nd	nd	nd	nd	21,60	32,82
Cefoperazone (50)	nd	nd	nd	nd	22,88	25,61
Cefuroxime (50)	nd	nd	nd	26,33	29,71	32,14
Aminoglucósidos						
Gentamicina (20)	nd	nd	nd	18,96	19,37	25,91
Kanamicina (160)	nd	nd	nd	23,08	24,60	26,45
Neomicina (60)	nd	nd	nd	nd	18,82	20,21
Estreptomina (150)	nd	nd	nd	17,01	19,66	21,58
Macrólidos						
Eritromicina (20)	nd	nd	nd	nd	17,26	21,71
Espiramicina (100)	nd	nd	nd	16,46	17,58	25,05
Tilosina (300)	23,54	24,81	26,51	27,70	30,04	39,07
Quinolonas						
Ciprofloxacina (15)	nd	nd	nd	28,27	29,76	34,13
Enrofloxacin (30)	nd	25,24	30,65	31,82	34,66	40,79
Flumequina (550)	nd	27,62	30,12	35,76	37,22	41,40
Norfloxacina (60)	nd	nd	nd	20,31	28,01	30,14
Tetraciclinas						
Clortetracilina (25)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Doxiciclina (15)	nd	nd	nd	nd	16,19	17,63
Oxitetraciclina (75)	nd	nd	nd	nd	16,72	18,90
Tetraciclina (85)	nd	nd	nd	nd	16,55	19,45

C₁₈= Concentraciones (µg/kg) recomendadas, que corresponden a un diámetro de 18 mm en su respectiva placa. Con negrita se indican los diámetros superiores al nivel de decisión de la placa; nd= no detectable

Por otro lado los macrólidos, eitromicina, espiramicina, provocan ligeras interferencias a altas concentraciones ($40 \times C_{18}$), mientras que la tilosina presenta una gran interferencia en esta placa incluso a concentraciones iguales a la C_{18} (300 $\mu\text{g}/\text{kg}$). También Nouws *et al.* (1999a) aprecian que 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de este mismo antibiótico producen diámetros de 22-28 mm, cuando se trabaja con leche de vaca y 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de eritromicina origina medidas de 16-22 mm.

En las quinolonas ensayadas, enrofloxacin y flumequina son las que presentan interferencias a los niveles más bajos ($2,5 \times C_{18}$) mientras que las otras dos (ciprofloxacina y norfloxacina) necesitan de una mayor concentración ($10 \times C_{18}$). Estas interferencias de las quinolonas son señaladas también por Nouws *et al.* (1999a) en su estudio en leche de vaca indicando una zona de inhibición entre 16 y 22 mm para 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de enrofloxacin y un diámetro mas elevado (22-28 mm) para el caso de la misma concentración de marbofloxacina.

Por el contrario las tetraciclinas no presentan ninguna intereferencia con el *Bacillus subtilis* pH 7,0 con zonas de inhibición, en los pocos casos que se presentan (Cuadro 61) menores que el nivel de decisión propuesto para esta placa (20 mm).

A modo de síntesis, se ha elaborado el Cuadro 62 donde se muestran las concentraciones de los diferentes agentes antimicrobianos que producen interferencias en el Sistema Microbiológico Multiplaca.

Al analizar dicho cuadro se debe tener presente que los niveles de sustancias antimicrobianas que figuran en él, corresponden a concentraciones capaces de formar halos en dos placas diferentes, aunque estas condiciones no necesariamente se deba cumplir de modo recíproco.

Es decir, el hecho que aparezcan zonas de inhibición en dos placas no denota la presencia de alguno de los agentes antimicrobianos que figuran en la intersección de ambas placas, ya que podrían hallarse dos sustancias quimioterapéuticas en una misma muestra de leche (por ejemplo penicilina y estreptomycin) y producir halos inhibitorios en dos placas (correspondientes a *Bacillus stearothermophilus* y *Bacillus subtilis* BGA, respectivamente).

También, la presencia de zonas de inhibición en dos placas diferentes, podría deberse a posibles efectos sinérgicos de agentes antimicrobianos que, además de poderse encontrar a niveles inferiores a los LMRs, ocasionarían halos con diámetros de inhibición apreciables. Este posible sinergismo no se ha estudiado en la presente tesis, aunque su análisis resultaría interesante para llevar a cabo en un futuro.

Por ello, el Cuadro 62 debe utilizarse únicamente con fines orientativos en el momento de decidir llevar a cabo un método confirmativo posterior, como por ejemplo la cromatografía HPLC.

Cuadro 62. Concentraciones ($\mu\text{g}/\text{kg}$) de agentes antimicrobianos en leche de oveja que producen interferencias en el Sistema Microbiológico Multiplaca

Antimicrobiano	<i>B.stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i> C953	<i>B subtilis</i> BGA pH 8,0	<i>M luteus</i> ATCC 9341	<i>E coli</i> ATCC 11303	<i>B cereus</i> ATCC 11778	<i>B subtilis</i> BGA pH 7,0
Penicilina "G"		-	20 (+++)	-	-	20 (+++)
Amoxicilina		-	60 (+++)	-	-	-
Cloxacilina		-	1200 (++)	-	-	600 (+++)
Oxacilina		-	100 (+)	-	-	400 (+)
Cefadroxilo		-	-	-	-	2000 (+)
Cefalexina		-	-	-	-	1500 (+)
Cefoperazone		-	2000 (+++)	125 (+++)	-	1000 (++)
Cefuroxime		-	1000 (++++)	2000 (+)	-	500 (+++)
Gentamicina	100 (+)		-	-	-	800 (+++)
Kanamicina	1600 (+)		-	-	-	1600 (++)
Neomicina	600 (+)		-	-	-	2400 (+)
Estreptomycin	1500 (+++)		-	-	-	6000 (+)
Eritromicina	200 (+)	100 (++)		-	-	800 (+)
Espiramicina	1000 (++)	2000 (+)		-	2000 (+)	4000 (+)
Tilosina	300 (+++)	1500 (+)		-	6000 (+)	< 300 (+)
Ciprofloxacina	-	300 (+)	-		-	150 (+++)
Enrofloxacin	1200 (+++)	600 (+++)	-		-	150 (+++)
Flumequina	-	5500 (+)	-		5500 (++)	1375 (+++)
Norfloxacin	-	1200 (++)	-		-	600 (+)
Clortetraciclina	-	-	-	1000 (+)		-
Doxiciclina	-	-	-	-		-
Oxitetraciclina	1500 (+)	-	-	3000 (+++)		-
Tetraciclina	850 (+)	-	-	1700 (++)		-
Sulfadimetoxina	-	-	-	-	-	
Sulfametazina	-	-	-	-	-	
Sulfanilamida	-	-	-	-	-	
Sulfatiazol	-	-	-	-	-	

Diámetros: < 20 mm = (-); 20-22mm = (+); 22-24mm = (++) y > 24mm = (+++)

Una alternativa interesante, antes de aplicar alguna técnica analítica específica, podría ser la realización de disoluciones de las muestras de leche que producen halos inhibitorios en dos placas, ya que la mayoría de las interferencias (a excepción de la estreptomycin, gentamicina y tilosina en la placa de *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*) se originan por la presencia de concentraciones elevadas, que van desde 5 hasta 40 veces el nivel que produce una zona de inhibición apreciable en la placa correspondiente a cada fármaco.

V. CONCLUSIONES

De los resultados de este trabajo, se deducen una serie de conclusiones que se exponen a continuación, teniendo en cuenta los distintos estudios y experimentos realizados y clasificándolas en función de ellos.

Primer estudio: Evaluación del método microbiológico de cribado Eclipse^a “100 ov” en la leche de oveja

Respecto a la aplicación del método Eclipse[®] “100ov” en la leche de oveja las conclusiones obtenidas a partir de los resultados experimentales son las siguientes:

- El método microbiológico Eclipse[®] “100 ov” presenta una elevada selectividad en el análisis de muestras de leche de oveja sin conservante (0,99%), aunque disminuye con el uso del conservante azidiol (0,91 %).
- La variación de la composición de la leche debido al estado de lactación, no ha presentado efectos significativos sobre los resultados del método.
- Los límites de detección calculados de forma visual presentan de forma general valores algo superiores a los calculados a través de medidas fotométricas.
- La sensibilidad del método es adecuada para el grupo de los antibióticos betalactámicos, ya que sus límites de detección calculados mediante medidas fotométricas, se aproximan a los Límites Máximos de Residuos fijados por la Unión Europea, para la penicilina “G” (4 µg/kg), amoxicilina (5 µg/kg) , cloxaciclina (67 µg/kg), oxacilina (25 µg/kg), cefalexina (101 µg/kg) y cefoperazone (86 µg/kg). También tres de las sulfonamidas, estudiadas, presentaron límites de detección próximos al LMR (157 µg/kg sulfadimetoxina, 218µg/kg sulfanilamida y 237µg/kg sulfatiazol).
- Para los antimicrobianos de los grupos de aminoglucósidos, macrólidos, quinolonas y tetraciclinas, así como para la sulfametazina los límites de detección calculados han sido superiores a los LMR no siendo adecuada la sensibilidad del método para su detección.

De modo general se puede concluir que el método Eclipse[®] “100 ov”, resulta una técnica adecuada como método de cribado o “screening” de la leche de oveja sin conservante, en especial para el grupo de los betalactámicos y algunas sulfonamidas, mientras que para el resto de antimicrobianos ensayados los límites obtenidos se alejan de los marcados por la legislación. Resulta necesario mejorar las condiciones de sensibilidad del método para ampliar el espectro de detección de residuos de antimicrobianos y de este modo ofrecer una herramienta más completa para el análisis de los mismos.

Segundo estudio: Aplicación del Sistema Microbiológico Multiplaca (SMMP) en la leche de oveja

De los resultados experimentales del estudio de aplicación del Sistema Microbiológico Multiplaca o Mutiresiduo aplicado a la leche de oveja se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- Se ha comprobado que cuando se emplea el SMMP, inicialmente desarrollado para leche de vaca, en leche de oveja aparecen diferencias significativas en el tamaño de la zona de inhibición de todas las placas empleadas. Lo que implica que es necesario realizar el estudio de validación de dicho sistema a la leche de la especie ovina.
- Los resultados estadísticos del análisis de la varianza de las variables concentración de antibiótico, preparación del medio e interacción entre ambos factores, muestran que en todos los casos resultó significativo el efecto de la concentración de agente microbiano, mientras que, los otros factores no presentaron ningún efecto significativo.
- En todos los casos se ha observado que los diámetros medios de las zonas de inhibición aumentan conforme la concentración es mayor, con diferencias significativas entre ellos. Además los coeficientes de variación fueron inferiores al 3% para las diferentes concentraciones de cada antimicrobiano, poniendo de manifiesto la buena repetibilidad de las diferentes placas que constituyen el sistema.
- Las ecuaciones de regresión obtenidas a través del modelo de regresión lineal que relacionan la concentración de antibiótico y el diámetro de la zona de inhibición, presentaron en todos los casos coeficientes muy elevados (0,9719-0,9995), lo que señala una gran linealidad en la respuesta y la posibilidad de establecer “un nivel de decisión“ a concentraciones iguales o inferiores al LMR. Se considera este nivel o diámetro de decisión de: 20 mm para los betalactámicos, aminoglucósidos, macrólidos, tetraciclinas y sulfonamidas y de 22 mm en el caso de las quinolonas.
- El método SMMP presenta una elevada selectividad en el análisis de muestras de leche de oveja calentadas que oscila entre el intervalo 98% -100% para las diferentes placas que lo componen.
- En el estudio de la especificidad cruzada se han encontrado interferencias en la destinada a la detección de antibióticos betalactámicos por parte de aminoglucósidos y macrólidos, resaltando especialmente la tilosina, que para todas las concentraciones presentó un diámetro de inhibición superior a 24 mm. En el resto de placas la especificidad fue buena, presentándose pequeñas interferencias a elevadas concentraciones de algunos antimicrobianos.

En resumen, se puede concluir que el SMMP es un método válido para la detección de residuos, por lo que podría ser utilizado en los laboratorios de control de calidad para la confirmación e identificación preliminar de residuos de antimicrobianos en el caso de la leche de oveja.

Por último hay que señalar que independientemente de las conclusiones comentadas, el estudio de estas dos técnicas, establece un punto de partida para futuros estudios sobre los métodos de detección de inhibidores en la leche de oveja. Así, sería interesante, no solo el mejorar las técnicas de cribado en cuanto a su sensibilidad, sino también desarrollar un sistema microbiológico, de similares características del SMMP, más automatizado que resulte de mayor accesibilidad en los Laboratorios interprofesionales y de Salud Pública, potenciando de este modo, el empleo rutinario de estas técnicas microbiológicas de confirmación e identificación preliminar.

De este modo, con el establecimiento de un sistema adecuado de control en sus diferentes etapas, se conseguirá evitar que la leche de oveja y sus productos derivados pudieran presentar residuos de medicamentos, por encima de los límites establecidos por la legislación, y se colaboraría con uno de los principios básicos de la seguridad alimentaria que es la protección del consumidor.

VI. BIBLIOGRAFÍA

Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA), 1990. "Méthode officielle d'analyse relative à la détection des antibiotiques et des sulfamides dans les laits destinés à l'alimentation humaine u animale". Communication du laboratoire LMV/ITC/FIC2. Laboratoire d'étude et de recherches sur les médicaments vétérinaires et les désinfectants. Fougères, Francia.

Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA), 1999. "STAR Protocol. Screening test for Antibiotic Residues. Second step". Communication du laboratoire LMV/ ITC/PO5/12AN-V. Laboratoire d'étude et de recherches sur les médicaments vétérinaires et les désinfectants. Fougères, Francia.

ALTHAUS R. L., 1999. "Métodos de detección de inhibidores en leche de oveja de raza Manchega". Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. 309 pp.

ALTHAUS R., MOLINA P., RODRIGUEZ M., FERNANDEZ 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. L., MOLINA M. P., PERIS C., TORRES A., FERNÁNDEZ N., 2003a. "Accuracy of BRT and Delvotest Microbial inhibition test as affected by composition of ewe's milk". *J. Food Prot.*, 66: 473-478.

ALTHAUS R. L., TORRES A., MONTERO A., BALASCH S., MOLINA M. P. 2003b. "Detection limits of antimicrobials in ewe milk by Delvotest[®] photometric measurements". *J. Dairy Sci.*, 86: 457-463.

ANALYTIC IN MILCH, AIM. 1998b. "The Brilliant Black Reduction Test (BRT) Background and basic information" 3/98. Informe Técnico. Analytik in milch productions und Vertriebs- GmbH. Munich.

ANALYTIC IN MILCH, AIM, 1998b. "The Brilliant Black Reduction Test (BRT)-MRL – Screening Test". 5/98. Informe Técnico. Analytik in milch productions und Vertriebs- GmbH.Munich.

ANALYTIC IN MILCH, AIM. 2003, Informes técnicos. <http://www.aim-bayern.de/>

ANDREW S. M., FROBISH R. A., PAAPE M. J., MATURIN L. J., 1997. "Evaluation of selected antibiotic residue screening test for milk from individual cows and examination of factors the affect the probability of false-positive outcomes". *J. Dairy Sci.*, 80: 3050-3057.

ANIFANTAKIS A., 1986. "Physico-chemical characteristics of ewe's milk as distinct from those of cow's milk" 42-53. *In* Production and utilization of Ewe's and Goat's milk. IDF Bull. N° 202. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica.

ANIFANTAKIS E.M., MATHIOUDAKIS I.G., GIANNACOPOULOU K.V., 1988. "Possibility of detecting antibiotics in ewe's milk and goats milk by Delvotest, Tic-Test and Intertest". *J. Dairy Sci.*, 16: 1-8.

ARCHIMBAULT P., BOUTIER C., FELLOUS R., MOSCAT G., 1980. "Influence de la nature de l'excipient sur l'élimination des antibiotiques administrés par voie intramammaire". *Rev. Med. Vet.*, 131: 209-222.

ARCHIMBAULT P., 1983. "Persistence in milk of active antimicrobial intramammary substances". Proceedings of the 2nd Symposium of the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology. Toulouse, 1982. Citado por Carlsson (1991).

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC), 1984. "Official methods of analysis". 42: 813-815. 14th edition. Ed. AOAC. Arlington.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC), 1995. "Official methods of analysis", 5: 33-36. 16th edition. Ed. AOAC. Arlington.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC), 2000. "Official Methods of Analysis". 33: 39-44. 17th edition. Ed. AOAC Arlington.

AURELI P., FERRINI A., MANNONI V., 1995. "Microbial presumptive identification of sulfonamide and antibiotic residues in animal foods". 203-204. *In* Residues of Antimicrobial Drugs and Other Inhibitors in Milk. IDF S. I. N° 9505. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica.

AURELI P., FERRINI A., MANNONI V., 1996. "Presumptive identification of sulfonamide and antibiotic residues in milk by microbial inhibitors tests". *Food Control*, 7:165-168.

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", Lisboa.

BARBOSA M., SUHREN G., BEUKERS R., 2004. "Suitability and application of available test kits for the detection of residues of antimicrobials in milk from species other than the cow. A review". IDF Bull. N° 390: 29-40. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica.

BEUKERS, R., 1991. "Some special aspects of Delvotest®". 20-23 *In* Inhibition substances in milk-current Analytical Practic. IDF Bull. N° 283. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica.

BEVIL R.F., 1989. "Sulfonamide residues in domestic animals". *J. Vet. Phar. Ther.*, 12: 241-246.

BISHOP J. R., WHITE C. H., 1984. "Antibiotic residue detection in milk. A review", J. Food Prot., 47: 647-652.

BOGAERTS R., WOLF F., 1980. "A standardized method for the detection of residues of antibacterial substances in fresh meat. Fleischwirtschaft, 60: 672-673.

BOTSOGLOU, N.A., FLEUTORIS, J.D., 2001. "Drugs residues in foods: Pharmacology, food safety, and analysis". Ed. Marcel Dekker. New York.

BRADY M. S., KATZ S. E., 1987. "Simplified Plate Diffusion System for Microbial Assays of Antibiotics". J. Assoc. Off. Anal. Chem., 70: 641-646.

CALDERON V., DIEZ P., GONZALEZ J., ASENJO M.J., BERENGUER J.A., 1994. "Microbiological quantification of antibiotic residues using two analytical designs". Rev. Esp. Cienc. Tecnol. Alim., 34: 210-217.

CALDERON V., 1995. "Técnica de las cuatro placas: volumen de medio de cultivo por placa". Comunicación de Laboratorio N° 24. Centro Nacional de Alimentación. Instituto de Salud Carlos III. Madrid.

CALDERON V., GONZÁLEZ J., DIEZ P., BERENGUER J.A., 1996. "Evaluation of a multiple bioassay technique for determination of antibiotic residues in meat with standard solutions of antimicrobials". Food Addit. Contam., 13: 13-19.

CALDERON V., 2001. "Control sanitario de residuos de antibióticos en carnes por métodos microbiológicos". Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. 217 pp.

CALDERON V. DIEZ P., GARCÍA E., 2003. "Técnica de cribado de residuos de antibacteriano con cinco placas". Comunicación de laboratorio N° 75. Centro Nacional de Alimentación. Agencia Española de Seguridad Alimentaria. Laboratorio Nacional de Referencia. Madrid.

CARLSSON A., BJÖRCK L., 1987. "The effect of some indigenous antibacterial factors in milk on the growth of *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*". Milchwissenschaft, 42:283-285.

CARLSSON A. BJÖRCK L, 1989. "Lactoferrin and lysozyme in milk during acute mastitis and their inhibitory effect in Delvotest". J. Dairy Sci., 72:3166.

CARLSSON A, BJÖRCK L, 1991. "Charm Test II for confirmation of inhibitory substances detected by different microbial assays in herd milk" J. Food Prot., 54: 32-36.

CODEX ALIMENTARIUS, 3, 1996. "Residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos". Codex Alimentarius, 3. Programa conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias, FAO. Roma.

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

CULLOR J. S., 1992. "Test for identifying antibiotic residues in milk: how well do they work". *Vet. Med.*, 87: 1235-1241.

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., VAN EENENNAAM A., GRADNER Y., PERANI L., DELLINGER J., SMITH W. L., THOMPSON T., PAYNE M. A., JENSEN L., GUTERBOCK W. M., 1994. "Performance of various test used to screen antibiotic residues in milk samples from individual animals". *J. AOAC Int.*, 77: 862-870.

CURRIE D., LYNAS L., KENNEDY G., McCAUGHEY J., 1998. "Evaluation of modified EC four plate method to detect antimicrobial drugs". *Food Addit. Contam.*, 15: 651-660.

CUTTING J. H. , KRESSLING, W .M. , BOND, F. L., McCARRON, J. E., KREUZER, K. S., HURLBUT, J. A., SOFOS, J. N., 1995. "Agarose gel electrophoretic detection of six beta-lactam antibiotic residues in milk". *J. AOAC Int.*, 78: 663-667.

CHARM S.E., CHI R.K., 1988. "Microbial receptor assay for beta-lactam antibiotics in milk: collaborative study". *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 65: 1186-1192.

CHARM S.E. RUTH G. P., 1993. "Advances in Charm technology for Antimicrobial residues in milk". 32-46. *In* Inhibitory substances in milk-current analytical practice. IDF Bull. N° 283. International Dairy Federation. Bruselas, Belgica.

CHARM S.E., ZOMER E., 1995. "The evolution and direction of rapid detection/identification of antimicrobial drug residues". 224-233. *In*: Residues of Antimicrobial Drugs and Other Inhibitors in Milk. IDF S. I. N° 9505. International Dairy Federation. Bruselas, Belgica.

CHOI J., YEE A.J., THMPSON D., SAMOLUK J., MITCHELL M., BLACK W.D., 1999. "Determination of fluoroquinolone residues in animal tissues using *Escherichia coli* as indicator organism. *J. AOAC Int.*, 82: 1407-1412.

DEBACKERE M., 1995. "Comparison of disk assay, Intest and Delvotest P sensitivity for antibiotic residues in milk". 41-53. *In* Residues of Antimicrobial Drugs and Other inhibitors in Milk. IDF S. I. N° 9505. International Dairy Federation. Bruselas, Belgica.

DECISIÓN 91/180/CE. Decisión de la Comisión , de 14 de febrero de 1991, por la que se adoptan determinados métodos de análisis y de prueba de la leche cruda y de la leche tratada térmicamente. Diario Oficial nº L 093, 1-48.

DECISIÓN 002/657/CE. Decisión de la Comisión, de 12 de agosto de 2002, por la que se aplica la Directiva 96/23/CEE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados. Diario Oficial nº L 221, 8-36.

DEL PRATO O. S., 1997. "Gli inibenti nel latte e i loro effetti sulle trasformazioni casearie". *Latte*, 22: 40-48.

DEWDNEY J.M., MAES L., RAYNAUD J.P., BLANC F., SCHEID J.P., JACKSON T., LENS S., VERSCHUEREN C., 1991. "Risk assessment of antibiotic residues of beta-lactams and macrolides in food-products with regard to their immunoallergic potential". *Food Chem. Toxicology*, 29: 477-483.

DIRECTIVA 2377/90/CEE del Consejo del 26 de Junio de 1990, por el que se establece un procedimiento comunitario de fijación de los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal. Diario oficial nº L224, 1-8.

DIRECTIVA 92/46/CEE del Consejo del 16 de Junio de 1992, por la que se establecen las normas sanitarias aplicables a la producción y comercialización de leche cruda, leche tratada térmicamente y productos lácteos. Diario Oficial nº L 268, 18-24.

DIRECTIVA 94/71/CEE del Consejo de 13 de diciembre de 1994 por la que se modifica la Directiva 92/46/CEE por la que se establecen las normas sanitarias aplicables a la producción y comercialización de leche cruda, leche tratada térmicamente y productos lácteos. Diario Oficial nº L 368, 33-37.

DIRECTIVA 96/23/CE 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.

DIRECTIVA 2001/82/CEE del Parlamento europeo y del consejo de 6 de noviembre de 2001 por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos veterinarios. Diario Oficial nº L 311, 1-66.

DIXON-HOLLAND, D.E., 1992. "ELISA and its application for residue analysis of antibiotics and drugs of animal origin". 57-74. *In: Analysis of antibiotic/drug residues in food products of animal origin*. Ed. V. K. Agarwal, Plenum Press. New York.

DUDRIKIVÁ E., SOKOL J., NAGY J., CABADAJ R., BURDOVÁ O., 1995. "Detection of oxytetracycline residues in bovine milk by HPLC". 293-296 *In*

Residues of antimicrobials drugs and other inhibitors in Milk, IDF S. I. N° 9505. International Dairy Federation. Bruselas, Belgica.

FABRE J. M., MORETAIN J. P., ASCHER F., BROUILLET O., BERTHELOT X., 1995. "Main causes of inhibitors in milk a survey in one thousand french dairy farms". 27-31. *In* residues of antimicrobial Drugs ans Other Inhibitors in milk. IDF S. I. N° 9505. International Dairy Federation. Bruselas, Belgica.

FEDERACIÓN INTERNACIONAL DE LECHERIA (FIL), 1984. "Recommended methods for somatic cell counting in milk". IDF Bull. N° 168. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica.

FEDERACIÓN INTERNACIONAL DE LECHERIA (FIL). 1991. "Detection and confirmation of inhibitors in milk and milk products". IDF Bull. N° 258. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica.

FEDERACIÓN INTERNACIONAL DE LECHERIA (FIL), 1997. "Guidance for the standardized description of microbial inhibidor test". IDF Group E-503 Antibiotics, Appendix 3: 16 pp.

FEDERACIÓN INTERNACIONAL DE LECHERIA (FIL), 2002. "Guidelines for the standardized description of microbial inhibitor test". IDF-FIL, Bull N° 183. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica.

FEDERACIÓN INTERNACIONAL DE LECHERIA-FOOD AGRICULTURE ORGANIZATION (FIL-FAO). 2004. Guide to good farming practice. Food Agriculture Organization of the United Nations. FAO. Roma.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, FDA, 2000. Analytical procedures and methods validation chemistry, manufacturing and controls documentation. U. S. Department of Health and human services. Food and drug administration. Rockville, MD.

FRANK S., 1995. 'Bestimmung der Nachweisgrenzen ausgewähler Antibiotika und Sulfonamide im Brillantschwarz-Reduktionstest". Diss. Universitat Diplomarbeit Thier. Triesdorf, Germany. 70 pp.

FSIS, 1991. "Use of seeded monolayer bioassay plates for antibiotic assay of animal tissues". Laboratory Comunication n° 65. Ed. Food Safety and Inspection Service. US Department of Agriculture. Washington D.C.

FUGATE H.G., 1974. "Determination of antibiotic residues in animal tissues. In : Microbiology Laboratory Guidebook". Ed. Food Safety and Inspection Service. US Departament of Agriculture. Washintong D.C.

GARDNER, I. A., CULLOR J. S., GALEY F. D., SISCHO W., SALMAN M., B. SLENNING H. E, TYLER J. W. 1996. "Alternatives for validation of diagnostic assays used to detect antibiotic residues in milk". J. Am. Vet. Med. Assoc., 209: 46-52.

GIST-BROCADES, 1997. "DELVOTEST[®]". Informe Técnico, 9 pp. Delft. Holanda.

GONZALEZ-LLANO D., RAMOS M., 1989. "Composición química de la leche de oveja". Ovis, 2: 9-19.

GOURSAND L. 1991. "Composición y propiedades fisico-químicas". 1-92. *In* Leche y productos lácteos: vaca-oveja-cabra. Ed. Acribia, Zaragoza.

GROVE D.C., RANDALL W.A., 1955. "Assay methods of Antibiotics". 12-14. *In* Medical Encyclopedia, Inc., New York.

GUDDING R., 1976. "An improved bacteriological method for the detection of sulfonamide residues in food". Acta Veterinaria Scandinavica, 17: 458-464.

HEESCHEN W. H., BLÜTHGEN A., 1991. "Current problems of chemical residues and contaminan". *In* Special addresses at IDF annual sessions. IDF Bull. N° 272. International Dairy Federation. Bruselas, Belgica.

HEESCHEN W. H., 1993. "Residues of antibiotics and sulfonamides in milk". 3-12. *In* Inhibitory substances in milk-current analytical practice". IDF Bull. N° 283, International Dairy Federation. Bruselas, Belgica.

HEESCHEN W. H., BLÜTHGEN A., 1995. "Veterinary drugs and pharmacologically active compounds". 16-39. *In* Residues and contaminants in milk products. IDF S. I. N° 9101. International Dairy Federation. Bruselas, Belgica.

HILLERTON J. E., HALLEY B. I., NEAVES P., ROSE M. D., 1999. "Detection of antimicrobial substances in individual cow and quarter milk samples using Delvotest microbial inhibitor tests". J. Dairy Sci., 82: 704-711.

HONKENEN-BUZALSKI T., REYBROECK W., 1997. Antimicrobials. 26-34. *In* Residues and contaminants in milk and milk products. IDF S. I. n° 9701. International Dairy Federation. Bruselas, Belgica.

INTERNATIONAL STANDARS ORGANISATION, ISO, 2002. "Milk and milk products. Guidelines for a standardized description of microbial inhibitor test". ISO/FDIS 13969/IDF183. International Organization and standardization and International Dairy Federation.

INTERNATIONAL STANDARS ORGANISATION, ISO, 2003. "Milk and milk products". Guidelines for a standardized description of inmuno or receptor assays for the detection of antimicrobial residues". ISO/FDIS 18330/IDF188. International Organization and standardization and International Dairy Federation.

JACQUET J., AUXEPAULES M., 1978. "Le problème de la pollution du lait par les antibiotiques. État actuel de la question". Bull. Acad. Vét. de France, 51: 73-79.

JASKCH P., 1988. "Der penzym test eine enzymatische schnellmethode zum nachweis von beta-lactam-antibiotika in Rohmilch". Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, Universität München, 29: 898-903

KAVANAGH F., 1975. "Microbiological Diffusion Assay II: Desing and Applications". J. Pharmaceutical Sci., 64: 1224-1229.

KAVANAGH F., 1989. "Theory and practice of Microbiological assaying for Antibiotics". J. Assoc. Off. Anal. Chem., 72: 6-10.

KOENEN-DIERICK K., OKERMAN L., DE ZUTTER L., DEGROODT J.M., VAN HOOF J, SREBRNIK S., 1995. " A one-plate microbiological screening test for antibiotic residue testing in kidney tissue and meat: an alternative to the EEC four-plate method?". Food Addit. Contam., 12: 77-82.

KORSRUD G. O., SALISBURY C. D. C., FESSER A. C. E. Mac NEIL, F. D. Mac NEIL J. D., 1992. "Evaluation and testing of charm test II receptor assays for the detection of antimicrobial residues in meat". 75-79. *In* Analysis of antibiotic/drug residues in food products of animal origin. Ed. V.K. Agarwal, Plenium Press. New York.

KORSRUD G. O., BOISO J. O., NOUWS J. F. M., Mac CNEIL J. D., 1998. "Bacterial inhibition test used to screen for antimicrobial veterinary drug residues in slaughtered animals". J. AOAC Int., 81: 21-25.

KRAMER R. A., HERBEN P. J., RENS P. V., AERTS M. M. L., 1995 "Confirmation of residues in milk of the beta-lactam Immec using coupled SPE-HPLC-Microbiological assay". 299-301. *In* Residues of Antimicrobial Drugs and Other Inhibitors in Milk. IDF S. I. N° 9505. International Dairy Federation. Bruselas, Belgica.

KURITTU J., LONNBERG S., VIRTA M., KARP M., 2000. Qualitative detection of tetracycline residues in milk with a luminiscence-based microbial method: the effect of milk composition and assay performance in relation to an immunoassay and a microbial inhibition assay. J. Food Prot., 63: 953-957.

LUITZ M., SUHREN G., 1995. "Advantages of photometrec evaluation of microbial inhibitor test". 177-181. *In* Residues of Antimicrobial Drugs and Other Inhibitors in Milk. IDF S. I. N° 9505. International Dairy Federation. Bruselas, Belgica.

LUITZ M., SUHREN G. y HEESCHEN W., 1996. "Interactions of antimicrobials in milk - consequences for the detection with Delvotest SP special". 28-31, *In* Residues of Antimicrobial Drugs and Other Inhibitors in Milk. IDF S. I. N° 9505. International Dairy Federation. Bruselas, Belgica.

LUITZ M., SUHREN G, HESSCHEN W., 1996. "Interactions of antimicrobials in milk–Consequences for the detection by a microbial inhibitor test". *Milchwissenschaft*, 51: 390-392.

LUTHMAN J., 1993. "Mastitis therapy in relation to antibiotic residues in milk". 69-75. IDF Bull. N° 283. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica.

MACHO M.L., 2003. "Enzimoinmunoanálisis en el análisis de residuos de antibióticos" 15ª Jornada sobre Residuos en Alimentos. Centro nacional de Alimentación. Agencia Española de Seguridad Alimentaria. Madrid.

MATEOS P. F., 2002. "Agentes antimicrobianos y microorganismos". Curso de microbiología. Ingeniería de Alimentos". [http://geocities.com/College Park/Lab/2960/Mic20.htm](http://geocities.com/CollegePark/Lab/2960/Mic20.htm)

MÄYRÄ-MÄKINEN, 1990. "t-101 test for antibiotic residues in milk". Scand. Dairy Inf., 2: 38-39

MÄYRÄ-MÄKINEN A., 1995. "Technological significance of residues for the dairy industry". 136-143. *In* Residues of Antimicrobial Drugs and Other Inhibitors in Milk. IDF S. I. N° 9505. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica.

MERCK & CO., 2000. "El manual Merck de Veterinaria". 5ª ed. Ed. Océano. Barcelona.

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

MILLER R. H., DOWLEN H.H., NORMAN H. D., 1995. "Relationship of sire's Predicted Transmitting Ability for milk somatic cell score (PTASCS) to daughters' incidence of clinical mastitis". J. Dairy Sci. , 78 (Supl. 1): 175.

MOATS W. A., 1983. "Detection and semiquantitative estimation of penicillin G and cloxacillin in milk by thin-layer chromatography". J. Agric. Food Chem., 31: 1348-1350.

MOLINA P., GALLEGO L., 1994. "Composición de la leche: factores de variación". 191-208. *In* Ganado ovino. Raza manchega. Ed. Mundiprensa. Madrid.

MOLINA P., ALTHAUS R. L., MOLINA A., ZORRAQUINO M. A., FERNANDEZ N., 2001. "Detection limits of antimicrobial agents in ewe milk by Brilliant Test Reduction -BRT®. 281. Proceeding of the 52nd Annual meeting of the European Association for Animal Production (EAAP, 2001). Budapest, Hungría .

MOLINA M. P., ALTHAUS R. L., BALASCH S., TORRES A., PERIS C. FERNANDEZ 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., FERNANDEZ N., 2003b. "Antimicrobial agent detection in ewes' milk by the microbial inhibitor test brilliant reduction test- BRT AiM®. *Int. Dairy J.*, 13: 821-826.

MONTERO M., 2001. "Puesta a punto de una técnica de postcribado, mediante un método microbiológico, para la detección de residuos de sustancias inhibidoras en leche cruda de vaca conservada con azidol". Trabajo fin de carrera. Universidad de Gerona. 251 pp.

MONTERO A., ALTHAUS R. L., MOLINA A., BERRUGA I, MOLINA M. P., 2004. Detection of antimicrobial agents by a specific microbiological method (Eclipse100®) for ewe milk. *Small Ruminant Res.* (en prensa).

MORÉTAJN J. P., 1996. "Elimination des médicaments vétérinaires dans le lait". Conferencia XIII Reunión de Técnicos especialistas en control de mastitis y calidad de leche. Pamplona.

MOUROT D., LOUSSOUARN S., 1981. "Sensibilité des ferments lactiques aux antibiotiques utilisés en médecine vétérinaire". *Rec. Med. Vét.*,157: 175-177.

MÜLLER F., JONES, 1993. "BR-Test and BRT-AS Methods". 24-28. *In* Inhibitory substances in milk -current analytical practice. IDF Bull. N° 283. International Dairy Federation. Bruselas, Belgica.

MYLLYNIEMI A. L., RINTALA R., BÄCKMAN C., NIEMI A., 1999. "Microbiological and chemical identification of antimicrobial drugs in kidney and muscle samples of bovine cattle and pigs". *Food Addit. Contam.*, 16: 339-351.

MYLLYNIEMI A-L., NUOTIO L., LINDFORS E., RANNIKKO R., NIEMI A., BÄCKMAN C., 2001. "A microbiological six-plate method for the identification of certain antibiotic groups in incured kidney and muscle samples". *Analyst*, 126: 641-646.

NOUWS J. F. M , KONING C. D. W., 1983. "Penetration of some antibiotics into the lacrimal fluid of sheep". *J. Vet. Sci.*, 5: 114-121.

NOUWS J., LOEFFEN G., SCHOUTEN J., EGMOND H., STEGEMAN H., 1995. "Improvement of the tube diffusion test with respect to detection of tetracycline macrolide, aminoglycoside and sulfonamide residues in raw milk". 222-223. *In* Residues of Antimicrobial Drugs and Other Inhibitors in Milk. IDF S. I. N° 9505. International Dairy Federation, Bruselas, Bélgica.

NOUWS J. F. M., LOEFFEN G., SCHOUTEN J., Van EGMOND H., KEUKENS H., STEGEMAN H., 1998. "Testing of raw milk for tetracycline residues". *J. Dairy Sci.*, 81: 2341-2345.

NOUWS J., Van EGMOND H., SHULDERS I., LOEFFEN G., SCHOUTEN J., STEGEMAN H., 1999a. "A microbiological assay system for assessment of raw milk exceeding EU maximum residue level". *Int. Dairy J.*, 9: 85-90.

NOUWS J., Van EGMOND H., LOEFFEN G., SCHOUTEN J., KEUKENS H., SMULDERS I., STEGEMAN H., 1999b. "Suitability of the charm hvs and a microbiological multiplate system for detection of residues in raw milk at eu maximum residue levels". *The Veterinary Quarterly*, 21:21-27.

ODA T., HIWAKI H., 1996. "Heat stability of 24 antibiotics in food extracts". *J. Food. Hyg. Soc. Japan*, 37: 97-103.

OKERMAN L., DE WASCH K., VAN HOOFF J., 1998. "Detection of antibiotics in muscle tissue with microbiological inhibition tests. Effects of the matrix". *Analyst*, 123: 2361-2365.

PACKHAM W., BROOME M. C., LIMSOWTIN G. K. Y. ROGINSKI H., 2001. "Limitations of standard antibiotic screening assays when applied to milk for cheesemaking". *Australian J. Dairy Tech.*, 56:15-18.

RANG H.P., DALE M. M., RITTER J.M., 2000. "Quimioterapia de enfermedades infecciosas y malignas". 742-748. *In Farmacología*, 4ª ed. Ed Harcourt. Madrid.

REAL DECRETO 109/95, de 25 de enero de 1995, de la Comisión Nacional o Europea de Evaluación por el que se establecen la utilización de los medicamentos debidamente registrados y autorizados para su comercialización y utilización. BOE, 3 de Marzo de 1995, nº 53.

REGLAMENTO (CEE) nº 1831/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2003, sobre los aditivos en la alimentación animal. Diario Oficial nº L 268, 29 -43.

REICHMUT J., SHUREN G., BEUKERS R., 1997. "Evaluation of microbial inhibitor test- the IDF approach". *Milchwissenschaft*, 52: 691-695.

REYBROEK W., 1995b. "Field test of screening test for the detection of antimicrobial residues in milk". 218-218. *In Residues of Antimicrobial Drugs and Other Inhibitors in Milk. IDF S. I. Nª 9505. International Dairy Federation. Bruselas, Belgica.*

ROMNEE J.M., 1995. "Determination of residues after antibiotics therapy". 102-103. *In Residues of Antimicrobial Drugs and Other Inhibitors in Milk. IDF S. I. Nª 9505. International Dairy Federation. Bruselas, Belgica.*

SALISBURY C. D.C., RIGBY C.E., CHAN W., 1989. "Determination of antibiotic residues in Canadian slaughter animals by thin layer chromatography-bioautography". *J. Agric. Food. Chem.*, 37: 105-108.

SANOFI BIO INDUSTRIES, 1996. "Test-101 detection d'antibiotiques et sulfamides dans le lait". Informe técnico, 12 pp. Finlandia.

SAS Institute Inc., 1998. "SAS users guide: Statistics version 6.12". SAS Institute Cary, NC.

SCHLEGLOVA J., RYSANEK D., 2000. "Effects of heat-processings of milk on validation characteristics of the Charm aim-96 and Delvotest SP screening tests". *Veterinari Medicina*, 45: 201-207.

SCHLIEPHAKE A., 1996. "Optische Dichtemessung des Wachstums Ausgewählter Bakterienstämme unter Hemmstoffeinfluß". Dissertation. Institutionen für Livsmedelsvetenskap. Escuela Superior de Ciencias Veterinarias. Universidad de Hannover. Alemania. 181 pp.

SENYK G.F., DAVIDSON J.H., BROWN J.M., HALLSTEAD E.R., SHERBON J. W. 1990. "Comparison of rapid test used to detect antibiotic in milk". *J. Food Prot.* 53: 158-164.

SEYMOUR E. H., JONES G. M., GILLIARD M. L., 1998. "Comparisons of on-farm screening test for detection or antibiotics residues". *J. Dairy Sci.*, 71: 539-544.

SHIFFMANN A. P., SCHÜTZ 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.

SIVAKESAVA S., IRUDAYARAJ J., 2002 "Rapid determination of tetracycline in milk by FT-MIR and FT-NIR spectroscopy". *J. Dairy Sci.*, 85: 487-493.

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

STERNESJO A., JOHNSON, 1998. "A novel rapid enzyme immunoassay (Fluorophos Beta screen) for detection of betalactam residues in exfarm raw milk". *J. Food Prot.*, 61: 808-811.

SOKOL J., DUDRIKOVÁ R., CABADAJ E., MATISOV'S E., 1995. "Solid-phase extraction and liquid-chromatography determination of oxitetracycline antibiotics in milk". 308-309. *In Residues of Antimicrobial Drugs and Other Inhibitors in Milk*. IDF S. I. N° 9505. International Dairy Federation. Bruselas, Belgica.

SORENSEN L.K., FREDERIKSEN M., 1995. "Determination of Trimethoprim in milk by HPLC". 300-301. *In M Residues of Antimicrobial Drugs and Other Inhibitors in Milk*. IDF S. I. N° 9505. International Dairy Federation. Bruselas, Belgica.

SORENSEN L.K., HANSEN P., 1995. "Determination os spiramycin and tylosin in milk by HPLC". 302-303. *In M Residues of Antimicrobial Drugs and Other Inhibitors in Milk*. IDF S. I. Issue N° 9505. International Dairy Federation. Bruselas, Belgica.

SUHREN G, HEESCHEN W., 1993. "Detection of tetracycline in milk by a bacillus cereus microtitre test with indicator". *Milchwissenschaft*, 48: 259-263.

- SUHREN G., 1995. "Possibilities and limitations of microbiological inhibitor test". 159-171. *In* Residues of Antimicrobial Drugs and Other Inhibitors in Milk. IDF S. I. N° 9505. International Dairy Federation. Bruselas, Belgica.
- SUHREN G., REICHMUTH J., WALTE H.G., 1996. "Detection of β -lactam antibiotics in milk by the penzym-test". *Milchwissenschaft*, 51: 269-273.
- SUHREN G., REICHMUTH J., 1998. "Nachweis von β -laktamantibiotikarückständen in milk-Erfahrungen mit dem SNAP-Beta-Laktamtest. D.M.Z. Lebensmittelindustrie und Milchwissenschaft, 119: 674-681.
- SUHREN G., 2002. "Hemmstoffe und Tierarzneimittelrückstände in milchrechtliche Grundlagen, Nachweisverfahren, Untersuchungssysteme". *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, 54: 35-71.
- SUHREN G., WALTE H. G., 2003. "Experiences with the application of method combinations for the detection of residues of antimicrobial drugs in milk from collecting tankers". *Milchwissenschaft*, 58: 536-540.
- SULLIVAN T. J., WEDNER J., SHATZ G. S., YECIES L. D., PARKER C. W., 1981. "Skin testing to penicillin allergy". *J. Allergy. Clin. Immunol.*, 68: 171-180.
- SUMANO H. S., OCAMPO L., 1997. "Quimioterapia de las enfermedades microbianas". 118.-137. *In* "Farmacología Veterinaria", 2ª ed. Ed. McGraw-Hill Interamericana. Madrid.
- TSAI C. E., KONDO F. 2001., "Improved agar difusión method for detecting residual antimicrobial agents". *J. Food Prot.*, 64: 361-366.
- 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, endotoxi-induced mastitis". *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 210: 1378-1384.
- VACHER P.Y., JEMMI T., 1997. "Abaque pour l'analyse d'antibiotiques et sulfamides par la méthode du test à 4 plaques et détermination des limites de détection de la méthode". *Trav. Chim. Aliment. Hyg.*, 88: 540-553.
- VAN EENENNAAM A. L., CULLOR J. S., PERANI L., CRADNER Y. A., SMITH W. L., DELLINGER J., GUTERBOCK W. M., 1993. "Evaluation of milk antibiotic residue screening test in cattle with occurring clinical mastitis". *J. Dairy Sci.*, 76: 3041-3053.
- VAN OS J. L., BEUKERS R., 1980. "A multitest system for detection of antibiotics in milk". *J. Food Prot.* 43: 510-511.
- VAN SCHEPDAEL A., HOOGMARTENS J., 2000. "Capillary electrophoresis of antibiotics: important veterinary drugs". IV Euroresidue Conference.

ZAADHOF H.J., MALTBAUER A., VORMEITER A., SCHWEIZER L., 1997. "Zureignung kommerzieller mikrobiologischer hemmstofftests als suchverfahren auf das vorhandensein von antiinfektiva in milch und erzeugnissen auf milchbasis. Archiv für Lebensmittelhygiene, 48: 132-144.

ZENG S. S., ESCOBAR E. N., BROWN-COWDER Y., 1996. "Evaluation of screening test for fetection of antibiotics residues in goat milk". Small Rum. Res., 21: 155-160.

ZEU-INMUNOTEC, 2001. "Eclipse 100". Informe técnico. Ed. ZEU-Inmunotec S. L. Zaragoza, España.

ZEU-INMUNOTEC, 2003. "Screening Plus". Informe técnico. Ed. ZEU-Inmunotec S. L. Zaragoza, España.

ZORRAQUINO M., 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 mamitis y calidad de leche. Pamplona.

ZORRAQUINO M., 1997. "Niveles de residuos de medicamentos veterinarios en leche por debajo de los límites máximos de residuos de la UE". XIV Reunión de técnicos especialistas en control de mamitis y calidad de la leche. Mallorca.

ZORRAQUINO M., 1998. "Límites de detección del método BRT en leche de vaca". XV Jornadas del Grupo de Técnicos especialistas en control de mamitis y calidad de la leche. Lugo.

ZORRAQUINO M., 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.