

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIA ANIMAL

MÁSTER EN PRODUCCIÓN ANIMAL



**VALIDACIÓN DE MÉTODOS DE CRIBADO PARA LA
DETECCIÓN DE ANTIBIÓTICOS EN LACTOSUERO DE
CABRA**

TRABAJO FIN DE MÁSTER

AUTORA:

María Gómez de Barreda Ros

DIRECTORA ACADÉMICA:

Dra. M^a Pilar Molina Pons

DIRECTORA EXPERIMENTAL:

Jennifer Giraldo Gómez

Valencia, Julio 2017

Este trabajo forma parte del proyecto "Trazabilidad de la presencia de antibióticos en leche, queso y lactosuero de cabra" (AGL2013-45147-R) financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad

AGRADECIMIENTOS

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

En primer lugar a mis directoras del trabajo, Pilar Molina y Jennifer Giraldo, por su tiempo, ayuda y paciencia.

A Roberto Cabizza por iniciarme en el mundo del laboratorio y del lactosuero.

A los trabajadores de la granja experimental de pequeños rumiantes, especialmente a Tamara Romero y a Ion Pérez.

A Mari Carmen Beltrán, por su ayuda desinteresada.

A mi familia.

Resumen

La presencia de residuos de antibióticos en la leche procedente de animales que han sido tratados con medicamentos veterinarios de forma terapéutica o profiláctica sin respetar las buenas prácticas de uso, puede tener graves consecuencias para la salud pública y el sector lácteo.

En el caso de la fabricación de queso, dependiendo de la naturaleza del antibiótico este puede quedar retenido mayoritariamente en la cuajada o ser eliminado junto al lactosuero. Hay que tener en cuenta que el lactosuero puede ser utilizado en alimentación animal o empleado para la elaboración de otros productos derivados (requesón, concentrados de proteínas, suero en polvo, etc.) por lo que la presencia de residuos de antibióticos en el lactosuero puede representar un riesgo para la seguridad alimentaria y la salud animal, así como para el medio ambiente, lo que hace necesario disponer de un sistema de control.

Actualmente se encuentran disponibles desde un punto de vista comercial métodos de cribado para la detección de antibióticos en la leche que pueden ser de tipo microbiológico que son inespecíficos o de unión a receptores proteicos que son específicos para la detección de una, dos o varias familias de antibióticos. Todos estos métodos han sido validados para su uso en leche de diferentes especies pero no para su empleo en lactosuero procedente de la elaboración del queso.

Por ello, el objetivo de este trabajo ha sido la validación de acuerdo a los criterios de la Decisión 2002/657/CE del método microbiológico Eclipse Farm 3G[®] acoplado al equipo e-Reader[®] y 3 métodos de cribado de unión a receptores (TwinSensor[®], 3AminoSensor[®] y QuinoSensor[®]) para la detección de los antibióticos más empleados en ganado caprino lechero.

Para su realización se han empleado muestras de lactosuero procedente de elaboraciones experimentales de queso a partir de leche de cabra sin antibiótico y adicionadas con distintas concentraciones de antibióticos (amoxicilina, bencilpenicilina, cefalexina, oxitetraciclina, gentamicina, tilosina, sulfatiazol y enrofloxacin) que se analizaron mediante los métodos de cribado.

Los resultados obtenidos para el método Eclipse Farm 3G[®] acoplado a e-Reader[®] indican que resulta necesario la difusión durante una hora a temperatura ambiente cuando se analiza lactosuero. El método presentó una especificidad con esta matriz muy elevada (97.7%) indicando un porcentaje bajo de resultados falsos positivos. Además el método resulta adecuado para la detección de antibióticos β -lactámicos (excepto para la amoxicilina), aminoglucosidos y tetraciclinas presentando poca sensibilidad para la detección de quinolonas. En el caso de los métodos de unión a receptores se alargaron los tiempos de incubación en el análisis de lactosuero, presentando el TwinSensor[®] una elevada capacidad de detección para β -lactámicos (excepto para la cefalexina) y tetraciclinas, así como también fue adecuada la encontrada con el QuinoSensor[®] para la enrofloxacin, mientras que el 3 AminoSensor[®] mostró una sensibilidad baja en la detección de gentamicina. En todos los casos la especificidad de los métodos de unión a receptores fue del 100%.

En conclusión, los métodos comerciales de cribado siguiendo el protocolo específico de análisis podrían ser una herramienta apropiada en el establecimiento de un sistema de control de la presencia de antibióticos en el lactosuero.

Palabras claves

Métodos de cribado, antibiótico, lactosuero, leche de cabra.

Resum

La presència de residus d'antibiòtics en la llet procedent d'animals que han sigut tractats amb medicaments veterinaris de forma terapèutica o profilàctica sense respectar les bones practiques d'ús, pot tindre greus conseqüències per a la salut pública i al sector làctic.

En el cas de la fabricació de formatge, depenent de la naturalesa del antibiòtic aquest pot quedar retingut majoritàriament en la quellada o ser eliminat junt al lactosèrum. Cal tindre en compte que el lactosèrum pot ser utilitzat en la alimentació animal o empleat per a l'elaboració d'altres productes derivats (mató, concentrats de proteïnes, sèrum en pols, etc.) pel que la presència de residus d'antibiòtics pot representar un risc per a la seguretat alimentària i la sanitat animal, així com per al medi ambient, sent necessari disposar d'un sistema de control.

Actualment es troben disponibles des d'un punt de vista comercial mètodes de cribatge per a la detecció d'antibiòtics a la llet, que poden ser de tipus microbiològic que són inespecífics o de unió a receptors proteics que són específics per a la detecció de una, dos o diverses famílies d'antibiòtics. Tots aquests mètodes han sigut validats per al seu ús a la llet de diferents espècies però no per al seu empleu al lactosèrum procedent de l'elaboració del formatge.

Per això, l'objectiu d'aquest treball ha sigut la validació d'acord a la Decisió 2002/657/CE del mètode microbiològic Eclipse Farm 3G[®] acoplat al equip e-Reader[®] i 3 mètodes de cribatge d'unió a receptors (TwinSensor[®], 3AminoSensor[®] i QuinoSensor[®]) per a la detecció dels antibiòtics més empleats al bestiar caprí lleter.

Per a la seua realització se han empleat mostres de lactosèrum procedent d'elaboracions experimentals de formatge a partir de la llet de cabra addicionada amb distintes concentracions d'antibiòtics (amoxicilina, bencilpenicilina, oxitetraciclina, gentamicina, tilosina, sullfatiazol i enrofloxacina) que van ser analitzades amb els mètodes de cribatge.

Els resultats obtinguts amb el mètode Eclipse Farm 3G[®] acoplat amb e-Reader[®] indiquen que resulta necessari la difusió durant una hora a temperatura ambient quan s'analitza lactosèrum. El mètode va presentar una especificitat amb aquesta matriu molt elevada (97.7%) indicant un percentatge baix de resultat falsos positius. A més, el mètode resulta adequat per a la detecció d'antibiòtics β -lactàmics (excepte per a la amoxicilina), aminoglucòsids i tetraciclins presentant poca sensibilitat per a la detecció de quinolones. En el cas dels mètodes d'unió a receptors es van allargar els temps d'incubació al anàlisi del lactosèrum, presentant el TwinSensor[®] una elevada capacitat de detecció per a β -lactàmics (excepte per a la cefalexina) i tetraciclins, així com també va ser adequada la trobada amb el QuinoSensor[®] per a la enrofloxacina mentre que 3AminoSensor[®] va mostrar una sensibilitat baixa en la detecció de gentamicina. En tots els casos la especificitat dels mètodes d'unió a receptors va ser del 100%.

En conclusió, els mètodes comercials de cribatge seguint el protocol específic d'anàlisi poden ser una eina apropiada en el establiment d'un sistema de control de la presència d'antibiòtics al lactosèrum.

Paraules claus

Mètodes de cribatge, antibiòtic, lactosèrum, llet de cabra.

Summary

The presence of residues of antibiotics in milk from animals that have been treated with veterinary medicinal products either therapeutic or prophylactic without respecting the good practices of use, can have serious consequences for public health and the dairy sector.

In the case of the manufacture of cheese, depending on the nature of the antibiotic it can be held mostly in curd or be disposed with the whey. Must be borne in mind that whey can be used in animal feed or employee for the manufacture of other products (curd, concentrated of protein, whey powder, etc.) by which the presence of residues of antibiotics in whey may represent a risk to food safety and animal health, as well as for the environment making it necessary to have a control system.

Screening methods for detection of antibiotics are currently available from a commercial standpoint in milk which may be microbiological type that are non-specific or binding to protein receptors that are specific for the detection of one, two or several families of antibiotics. All of these methods have been validated for use in milk of different species but not for use in whey from the cheese making.

Therefore, the objective of this work has been the validation criteria of Decision 2002/657/EC of microbiological method Eclipse Farm 3 G[®] coupled to the team e - Reader[®] and 3 screening methods of binding to receptors (TwinSensor[®], 3AminoSensor[®] and QuinoSensor[®]) for the detection of antibiotics used in dairy goats.

The whey samples from experimental elaborations of cheese from goat's milk were used without antibiotics and also fortified with different concentrations of antibiotics (amoxicillin, penicillin, cephalexin, oxytetracycline, gentamicin, tylosin, sulfatiazol and enrofloxacin) and then were analysed using the screening methods.

The results for the Eclipse Farm method 3G[®] coupled to e - Reader[®] indicates that it is necessary to samples predifusion for one hour at room temperature when whey is analyzed. The method presented with this array of very high specificity (97.7%) indicating a low rate of false-positive results. In addition the method is suitable for the detection of β -lactam antibiotics (except for amoxicillin), aminoglycosides and tetracyclines presenting cscarce sensitivity for the detection of quinolones. In the case of methods of receptors binding is necessary to elongated the time of incubation in the analysis of whey, presenting the TwinSensor[®] high detection capability for β -lactam (except for Cephalexin) and tetracyclines, as it was also adequate found with QuinoSensor[®] for enrofloxacin, while 3 AminoSensor[®] showed a less sensitivity in the detection of gentamicin. In all cases the methods of receptor binding show a high specificity (100%).

In conclusion, the commercial screening methods using specific analysis protocol could be an appropriate tool in the establishment of a control system for the presence of antibiotics in the whey.

Key words

Screening methods, antibiotic, whey, goat milk.

Índice General

I. INTRODUCCIÓN	1
1. EL LACTOSUERO	1
1.1.Generalidades	1
1.2.Las características del lactosuero	2
1.3.Usos del lactosuero	4
2.PRESENCIA DE ANTIBIÓTICOS EN LECHE Y EN PRODUCTOS DERIVADOS	7
2.1.Empleo de antibióticos en ganado lechero.....	7
2.2.Clasificación y características de los antibióticos	7
2.3.Presencia y consecuencias de antibióticos en la leche y derivados.....	8
3.CONTROL DE ANTIBIÓTICOS EN LA LECHE Y DERIVADOS	11
3.1.Medidas de control	11
3.2.Métodos microbiológicos de detección de antibióticos en la leche y derivados	13
3.3.Métodos de receptores proteicos de detección de antibióticos en la leche y derivados.....	14
3.4 Características de funcionamiento de los métodos la detección de antibióticos.	15
II. OBJETIVOS	18
III. MATERIAL Y MÉTODOS	19
1. DISEÑO EXPERIMENTAL	19
2. MUESTRAS DE LACTOSUERO	19
3. ANTIBIÓTICOS Y MUESTRAS FORTIFICADAS	20
4.MÉTODO ECLIPSE FARM 3G®	21
4.1 Protocolo de uso del método	21
4.1.1 Punto de corte (cut-off)	23
4.2 Características de funcionamiento	24
4.2.1 Capacidad de detección o (CC β)	24
4.2.2 Especificidad o selectividad	24
4.2.3 Robustez	24
5. MÉTODOS DE UNIÓN A RECEPTORES PROTEICOS	25
5.1 Protocolo de uso de los métodos de unión a receptores	25
5.2 Características de funcionamiento del método.....	26
5.2.1 Capacidad de detección (CC β)	26
5.2.2 Especificidad o selectividad	26
5.2.3 Robustez	27

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
1. CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS DE LACTOSUERO	28
2. RESULTADOS DEL MÉTODO ECLIPSE FARM 3G®	29
2.1 Protocolo de uso del método	29
2.2 Punto de Corte (cut-off)	30
2.3 Características de funcionamiento	31
2.3.1 Capacidad de detección (CCβ)	31
2.3.2 Especificidad	34
2.3.3 Robustez	34
3. RESULTADOS DE LOS MÉTODOS DE UNIÓN A RECEPTORES	36
3.1 Características de funcionamiento	36
3.1.1 Capacidad de detección (CCβ)	36
3.1.2 Especificidad o selectividad	39
V. CONCLUSIONES	42
VI. BIBLIOGRAFÍA	43

Índice de Tablas

Tabla 1. Composición de los diferentes tipos de lactosuero.....	3
Tabla2. Estudios del uso del lactosuero en diferentes especies ganaderas	6
Tabla 3. Clasificación de sustancias antimicrobianas usadas en medicina veterinaria.....	9
Tabla 4. Clasificación de los métodos cualitativos en función de las características de funcionamiento.....	16
Tabla 5. Número de repeticiones basadas en la cercanía de la predicción de la capacidad de detección (CCβ) al 95%.....	16
Tabla 6. Antibióticos empleados en el estudio.....	21
Tabla 7. Composición y pH del lactosuero de cabra experimental y comercial.....	28
Tabla 8. Valores del e-Reader[®] para el experimento de preparación de las muestras de lactosuero.....	29
Tabla 9. Límite Máximo de Residuos y límite de detección del método Eclipse Farm 3G[®] acoplado a e-Reader[®] de los antibióticos estudiados.....	31
Tabla 10. Límite Máximo de Residuos y capacidad de detección (CCβ) del método Eclipse Farm 3G[®] acoplado a e-Reader[®] de los antibióticos estudiados.....	32
Tabla 11. Resultados de la influencia del pH en muestras de suero fortificadas con antibióticos con el método Eclipse Farm 3G[®] acoplado a e-Reader[®].....	35
Tabla 12. Límite Máximo de Residuos y límite de detección de los métodos TwinSensor[®], 3AminoSensor[®] y QuinoSensor[®].....	37
Tabla 13. Límite Máximo de Residuos y capacidad de detección (CCβ) de los métodos TwinSensor[®], 3AminoSensor[®] y QuinoSensor[®].....	39
Tabla 14. Resultados del estudio de especificidad para los métodos de unión a receptores proteicos.....	40

Índice de Figuras

Figura 1. Esquema de las formas de aprovechamiento del lactosuero.....	5
Figura 2. Etapas de control, clasificación y características de los métodos de detección de inhibidores en la leche	12
Figura 3. Principio de los métodos microbiológicos de detección de antibióticos en la leche..	13
Figura 4. Principio de los métodos de unión a los receptores proteicos para la detección de antibióticos en leche	15
Figura 5. Eclipse Farm 3G® junto al e-Reader®	22
Figura 6. Incubador HeatSensor® (BIOSAN TDB-100) y lector fotométrico ReadSensor® (Small Case APP038).....	25
Figura 7. Métodos TwinSensor®, 3AminoSensor® y QuinoSensor®	26
Figura 8. Resultados de la media y del cut -off obtenidos con el e-Reader®	30

I. INTRODUCCIÓN

1. EL LACTOSUERO

1.1. Generalidades

El lactosuero o suero de quesería se define como el líquido resultante de la coagulación de la leche en la elaboración de queso tras la precipitación y separación de la caseína y gran parte de la grasa. Se considera al lactosuero como el principal subproducto en la industria quesera puesto que por cada Kg de queso elaborado, se produce por término medio entre 9 y 12 kilos de lactosuero (Almécija-Rodríguez; 2007). Este subproducto puede ser comercializado o tratado como un residuo según la gestión de la quesería productora.

Según los últimos datos disponibles de la FAO correspondientes a 2014 (FAOSTAT, 2017) la producción mundial de queso (queso de leche entera de vaca, de leche desnatada de vaca, de leche de oveja, de leche de cabra y de leche de búfala) fue de 22.651.605 de toneladas. Considerando la menor producción de lactosuero por kg de queso (9 kg de lactosuero/Kg de queso), la producción mundial anual de lactosuero en 2014 se podría estimar en, aproximadamente, 203.864.445 toneladas.

En el caso de España, según la FAO (FAOSTAT, 2017) la producción anual de queso, en 2014, fue de 227.769 toneladas. Por lo que se calcula que se produjeron alrededor de 2.049.921 toneladas de lactosuero. Las zonas geográficas más productoras de queso y por ende, de lactosuero fueron: de leche vaca toda la península pero fundamentalmente la cornisa Cantábrica, de leche de oveja Castilla y León junto a Castilla la Mancha y de leche de cabra Andalucía, el litoral mediterráneo, pirineo catalán y Canarias (InLac, 2017).

La producción de queso de cabra en España el año 2014 fue de más de 33.625 toneladas (FAOSTAT, 2017), convirtiéndose en el quinto productor mundial de este producto. Teniendo en cuenta esa cifra, ese año se produjeron 302.625 toneladas de lactosuero de cabra.

Debido a su alta carga orgánica, el lactosuero se considera el efluente más contaminante de la industria láctea (Villar, 2005). Durante muchos años, el lactosuero ha sido vertido incontroladamente a las aguas, lo que supone tanto el desaprovechamiento de un alimento como la contaminación del medio ambiente.

El lactosuero presenta una alta demanda bioquímica de oxígeno (DBO) de 30.000- 50.000 mg/litro y una demanda química de oxígeno (DQO) de 60.000-80.000 mg/litro (Macwan *et al.*, 2016; Mattos, 2015;). El vertido de grandes volúmenes de lactosuero sin depurar produce el fenómeno de eutrofización, con la consecuente pérdida de biodiversidad acuática (Flórez, 2016). Además, la administración de lactosuero directamente al suelo puede dañar su estructura física y química, reducir la producción de cultivos y termina por contaminar aguas subterráneas y superficiales (Guerrero *et al.*, 2012).

En España, la legislación medioambiental no permite el vertido del lactosuero al medioambiente (Real Decreto 1/2001) y es la industria quesera quién debe gestionar el lactosuero que produce, tratándolo o reutilizándolo en sus propias instalaciones o contratando a una empresa para su gestión, su empleo o transformación (Ley 22/2011).

La Guía de Mejores Técnicas Disponibles en España del sector lácteo (MAPAMA, 2005) propone medidas de recogida y almacenamiento del lactosuero en las queserías, ya que su recuperación y almacenamiento adecuado permite reducir su carga contaminante, el aprovechamiento de sus cualidades y la reducción del coste de depuración de las aguas residuales.

1.2. Las características del lactosuero

El lactosuero se comercializa generalmente de dos maneras, como “lactosuero dulce” o “lactosuero ácido” según el tipo coagulación empleado en la fabricación de queso y en función de su acidez.

Cuando la coagulación ocurre por la adición en la leche de enzimas coagulantes (animales, vegetales y/o microbianos) se obtiene una cuajada que es compacta, flexible, impermeable, contráctil y rica en calcio (Villar, 2005) y los sueros procedentes de estas coagulaciones son “dulces” y los más habituales en España (FEDNA, 2017).

En cambio, si la coagulación ocurre por acidificación mediante la adición de ácidos orgánicos o minerales en la leche, se obtiene una cuajada láctica que es friable, inelástica, porosa, no contráctil y está desmineralizada (Villar, 2005) y al lactosuero resultante se le llama lactosuero ácido. Estos lactosueros se obtienen principalmente de la elaboración de quesos blandos o de tipo fresco, además es un residuo de la fabricación de caseína (sueros de caseína).

La composición tanto del lactosuero dulce como del ácido se recoge en la Tabla 1, donde se puede observar que el principal componente de interés son las proteínas. El 70% de la proteína bruta del lactosuero corresponde a proteínas con un valor nutritivo superior al de la caseína, como son la β -lactoglobulina y la α -lactoglobulina, que son las más abundantes (Valencia & Ramirez, 2009), en menor proporción se encuentra la lactoferrina, la lactoperoxidasa, las inmunoglobulinas y los glicomacropéptidos, entre otras (Van de Voorde *et al.*, 2014). El alto valor biológico de las proteínas del lactosuero se debe a su contenido en aminoácidos esenciales, especialmente aquellos que contienen azufre (González, 1996).

Tabla 1. Composición de los diferentes tipos de lactosuero.

	Lactosuero dulce (gr/kg) ¹	Lactosuero ácido (gr/kg) ¹	Lactosuero dulce de cabra (gr/kg) ²
Sólidos Totales (ST)	55-75	55-65	56,6-65,6
Lactosa	40-50	40-50	45,5-49,5
Grasa Bruta (GB)	0-5	0-5	0-8
Proteína Bruta (PB)	9-14	7-12	8,6-14,2
Cenizas:	4-6	6-8	5,3-5,6
Calcio	0,4-0,6	1,2-1,4	-
Fósforo	0,4-0,7	0,5-0,8	-
Potasio	1,4-1,6	1,4-1,6	-
Cloruros	2,0-2,2	2,0-2,2	-
Ácido láctico	0-0,3	7-8	-
pH	>6	<4,5	6,54-6,71
Grados Dornic	< 20°	> 50°	20°

Fuentes: ¹Abaigar (2009); ²Giraldo (2014), datos de lactosuero experimental.

También el lactosuero presenta una alta cantidad de minerales donde destaca el potasio, seguido del calcio, fósforo, sodio y magnesio (Parra-Huertas, 2009). Además, contiene vitaminas hidrosolubles de valor como son las del grupo B o ácido ascórbico.

Respecto a su color, el lactosuero presenta coloración amarilla-verdosa, por la presencia las proteínas solubles y sales disueltas (Callejas-Hernández *et al.*, 2012) y por la ausencia de la caseína, responsable del color blanco opaco de la leche (Cuartas, 2005).

1.3. Usos del lactosuero

Tradicionalmente el queso se elaboraba para autoconsumo o en pequeñas queserías con una producción a pequeña escala y dependiente de la época de lactación del ganado lechero. El lactosuero producido en la mayoría de casos se proporcionaba al ganado, pero también era consumido por los humanos directamente o como producto elaborado como el requesón o ricotta, el cottage inglés, el mizithra griego o los gjetost y flotemysost noruegos. Son los llamados quesos de suero, compuestos principalmente por proteína sérica y obtenidos mediante coagulación térmica a 80-90°C (Berruga *et al.*, 2000).

En la actualidad el lactosuero se ha convertido en un subproducto problemático debido a la incapacidad de la industria de asumir en su totalidad el alto volumen de su producción junto a su capacidad contaminante. El aprovechamiento del lactosuero en la misma quesería o su transporte a otras industrias requiere de grandes inversiones tanto en instalaciones como en personal, lo que no está al alcance de pequeñas y medianas queserías (Cebrián *et al.*, 2016).

El lactosuero es un producto versátil con muchas aplicaciones en distintos sectores tanto por sus propiedades nutricionales como físico-químicas y su utilización es necesaria para reducir el componente contaminante. En la Figura 1 se presenta un esquema de las formas de aprovechamiento del lactosuero donde se puede observar que en la alimentación humana, a parte de la producción de quesos de suero, también es consumido de forma líquida o deshidratada para la obtención concentrada de proteína y lactosa. Algunos alimentos elaborados con lactosuero son considerados como “alimentos funcionales” debido a sus efectos beneficiosos para la salud por su condición de probiótico (Madureria *et al.*, 2005; Hernández-Rojas & Vélez-Ruíz, 2014). Las proteínas del lactosuero actúan como prebiótico fortaleciendo el sistema inmunológico y el sistema cardiovascular o mejorando el rendimiento deportivo (Walzem *et al.*, 2002).

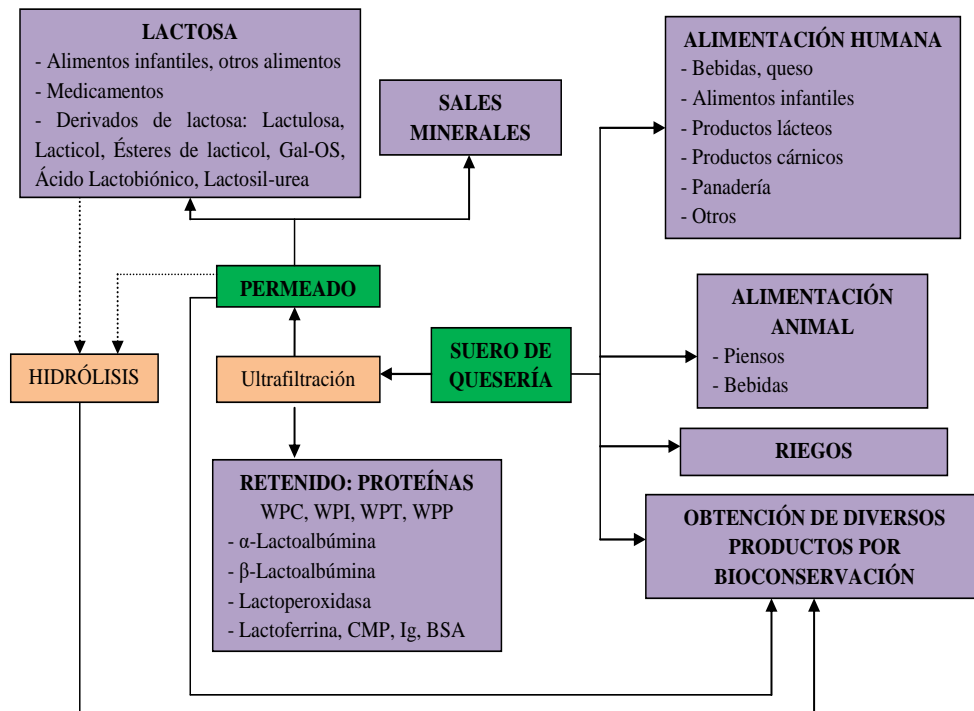


Figura 1. Esquema de las formas de aprovechamiento del lactosuero.

Fuente: Berruga et al. (2000).

Además como se presenta en la Figura 1, otro de los usos importantes del lactosuero es en la alimentación animal, aunque cayó en desuso tras el desarrollo de la industria de los piensos compuestos. Pero con el desarrollo de nuevos equipos de fabricación y distribución líquida se ha retomado su interés como recurso alimenticio (Rodríguez-Estévez & Mata-Moreno, 2008). En la Tabla 2 se recogen diferentes estudios del uso de lactosuero en distintas especies ganaderas.

El lactosuero también se está utilizando para fines no alimenticios, como fitosanitario (Reglamento (UE) 2016/560), ya que se le asocia propiedades fungicidas (Bettioli, *et al.*, 2008). También es un componente utilizado en la industria farmacéutica y cosmética (EFEAGRO, 2012) y del mismo también se puede extraer biogás (Hernández, 2015). Por último, se están desarrollando proyectos para obtener a partir del lactosuero bioplásticos de polihidroxibutirato, un material biodegradable y cuya producción necesitaría menos recursos económicos que otros materiales plásticos (AINIA, 2016).

Tabla 2. Estudios del uso del lactosuero en diferentes especies ganaderas.

Autor/es	Especie	Conclusiones del estudio
DeLoach (1990)	Broiler	<i>La inclusión de lactosuero en la dieta reduce la presencia de Salmonella typhimurium en el epitelio intestinal durante los primeros días de vida de los broilers.</i>
Van Winsen et al. (2000)	Porcina	<i>La alimentación líquida en cerdos disminuye la prevalencia de Salmonella spp.</i>
Abaigar (2009)	Porcina	<i>El lactosuero puede incorporarse al pienso en forma concentrada (15-20% en MS), esto permite incorporar más cantidad de lactosuero en las dietas de los cerdos jóvenes), pero en cerdos en fase de acabado y cerdas gestantes hay que contar con la menor digestibilidad de la lactosa</i>
Shariatmadar & Forbes (2010)	Aves	<i>Aunque las aves no tienen la enzima lactasa, el lactosuero puede fermentarse en buche e intestino grueso, donde se producen ácidos gases volátiles de los que se aprovecha su contenido energético. Debe controlarse la tasa de inclusión del lactosuero en la dieta pues pueden producirse diarreas y disminuir la tasa de ingestión de pienso.</i>
Llanes & Gozzini (2013)	Porcina	<i>El lactosuero como alimentación líquida reduce los problemas de ingestión en el destete, lactación y verano. Con la edad los cerdos van perdiendo su capacidad de digerir la lactosa y su incorporación en la dieta debe ser progresiva para evitar diarreas.</i>
Gutiérrez et al. (2014)	Broiler, gallina de puesta, ovino	<i>La incorporación en el pienso de distintas concentraciones de lactosuero mejora en todos los casos los rendimientos obtenidos en todos los parámetros estudiados (tasa de puesta, ingesta diaria, índice de conversión y ganancia de peso).</i>
López-Díaz (2014)	Caprino	<i>La inclusión de lactosuero como bebida aunque no aumenta producción de leche pero sí el aumento en la misma el porcentaje de extracto seco, grasa y proteína.</i>
Pineda-Quiroga et al. (2015)	Broiler	<i>Se ha demostrado que dietas de iniciación suplementadas con un lactosuero en polvo (6%) o con concentrado proteico de lactosuero (8%) mejora parámetros productivos como la Ganancia Media Diaria (GMD) o el Índice de Conversión (IC) comparándolos con piensos sin la suplementación del lactosuero.</i>

2. PRESENCIA DE ANTIBIÓTICOS EN LECHE Y EN PRODUCTOS DERIVADOS

2.1. Empleo de antibióticos en ganado lechero

Los antimicrobianos son medicamentos utilizados para prevenir y tratar infecciones bacterianas y son fundamentales tanto para la salud humana como animal.

En las explotaciones de ganado lechero se emplean antibióticos para tratar o prevenir infecciones bacterianas (pasterelosis, artritis, reticuloperitonitis traumáticas, etc.), como tratamiento secundario tras infecciones víricas (síndrome respiratorio bovino, etc.), o como profiláctico tras intervenciones veterinarias (cirugías, partos, etc.).

Pero la patología más prevalente en las explotaciones lecheras es la mamitis, pues produce las mayores pérdidas económicas por una menor producción y calidad de la leche ordeñada. Además, su difícil erradicación por los casos subclínicos conlleva gastos sanitarios y pérdida de animales. Por ello, la mamitis es la principal causa del uso de la terapia antibacteriana en el ganado lechero (Menzies & Ramanoon, 2001).

En el ganado ovino y caprino según Berruga *et al.*, (2000) es muy común el tratamiento de la mamitis durante la lactación (72% en ovejas y 76,9% en cabras). Los antibióticos de elección por los veterinarios los β -lactámicos (56,8%), seguidos de los macrólidos, aunque su uso es mucho menos frecuente (18,3%). Comparando con las ovejas, se observa una tendencia en cabras del uso de las tetraciclinas para el control de la mamitis.

Además, al ser un sector minoritario el del ganado ovino y caprino lechero es común la práctica del uso extra-label de medicamentos (administración de medicamentos en especies distintas para las que ha sido prescrito originalmente). La utilización de estos medicamentos supone un riesgo por la aparición de residuos en la leche ya que se desconoce su metabolización y actuación farmacocinética en esas especies (Beltrán, 2016).

2.2. Clasificación y características de los antibióticos

Desde el descubrimiento por Alexander Fleming (1881-1955) en 1928 de la capacidad del hongo *Penicillium notatum* para lizar las bacterias de *Staphylococcus aureus* se han descubierto una docena de nuevos tipos de antibiótico y

optimizado o sintetizado cerca de una centena (Sánchez de Rivas, 2006). Las distintas familias han sido clasificadas según su mecanismo de acción, eficacia clínica por su espectro de acción o su composición química.

En la Tabla 3 se recogen las sustancias antimicrobianas con mayor aplicación en veterinaria agrupadas según la composición química.


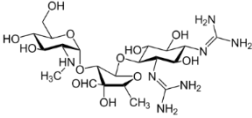
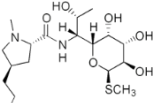
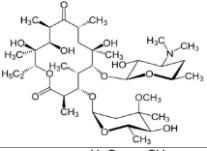
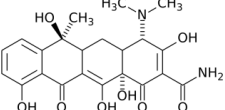
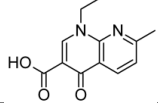
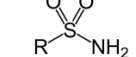
El término antibiótico abarca a las sustancias antimicrobianas que provengan de bacterias, actinomices, sustancias naturales o químicos sintéticos (Gimeno & Ortega, 2005). Los antibióticos presentan dos mecanismos de actuación bactericida o bacteriostático. Tienen un mecanismo bactericida cuando son capaces de producir la muerte de los microorganismos (penicilinas, cefalosporinas, aminoglucósidos o polimixinas). Los antibióticos bacteriostáticos inhiben el crecimiento y la multiplicación del patógeno sin eliminar a las bacterias presentes y será el sistema inmune del propio individuo quien ejerza la acción destructora (tetraciclinas, cloranfenicol, macrólidos, lincomicinas o sulfamidas) (Anadón, 2007).

La elección de un antibiótico como profiláctico o como terapéutico debe realizarse atendiendo a un gran número de condicionantes como la etiología de la enfermedad, la capacidad para alcanzar el foco de infección, la toxicidad tanto para el patógeno como para el hospedador, a sus efectos de debilidad inmunológica en el hospedador, los posibles antagonismos o sinergias con otros medicamentos, la edad del hospedador, la posibilidad de aparición de resistencias, a la vía y frecuencia de administración, a la dosis efectiva, etc. (Gimeno & Ortega, 2005; Anadón & Martínez-Larrañaga, 1996).

2.3. Presencia y consecuencias de antibióticos en la leche y derivados.

La leche es una vía natural de eliminación de muchos antibióticos y de sus metabolitos (Llanos, 2002). Por tanto, la presencia de antibiótico en la leche o sus productos derivados se consideran un residuo de medicamento veterinario según la definición que hace el Reglamento 470/2009/CE: “todas las sustancias farmacológicamente activas, ya sean principios activos, excipientes o productos de degradación y sus metabolitos que permanecen en productos alimenticios obtenidos a

Tabla 3. Clasificación de sustancias antimicrobianas usadas en medicina veterinaria.

Grupos	Características	Estructura	Efecto Bacteriano	Mecanismo de acción	Sustancias
β-lactámicos	<ul style="list-style-type: none"> • Antibióticos naturales • Amplio espectro 		Bactericida	Inhibidores de la síntesis de la pared celular	<ul style="list-style-type: none"> • Penicilinas: amoxicilina, ampicilina, benzilpenicilina, cloxacilina, etc. • Cefalosporinas: cefalexina, ceftiofur, cefoperazona, cefquinoma, etc.
Aminoglucósidos	<ul style="list-style-type: none"> • Antibióticos naturales 		Bactericida	Inhibición síntesis de proteínas	Gentamicina, kanamicina, neomicina, estreptomina, etc.
Lincosamidas	<ul style="list-style-type: none"> • Antibióticos naturales 		Vinculado a concentración aplicada	Inhibición síntesis de proteínas	Clindamicina, lincomicina, pirlimicina, etc.
Macrólidos	<ul style="list-style-type: none"> • Antibióticos naturales 		Bacteriostático	Inhibición síntesis de proteínas	Eritromicina, espiramicina, tilmicosina, tilosina, etc.
Tetraciclinas	<ul style="list-style-type: none"> • Antibióticos naturales • Amplio espectro 		Bacteriostático	Inhibición síntesis de proteínas	Clortetraciclina, oxitetraciclina, tetraciclina, doxiciclina, etc.
Quinolonas	<ul style="list-style-type: none"> • Antibióticos sintéticos • Amplio espectro 		Bactericida	Inhibición síntesis de ácidos nucleicos	Enrofloxacin, marbofloxacin, norfloxacin, etc.
Sulfonamidas	<ul style="list-style-type: none"> • Antibióticos sintéticos 		Bacteriostático	Inhibición síntesis de ácidos nucleicos	Sulfadiazina, sulfadimetoxina, sulfametacina, sulfatiazol, etc.

partir de los animales a los que se les hubiese administrado el medicamento veterinario de que se le trate”.

La aparición de antibióticos en la leche es una consecuencia de la mala praxis del uso de los antibióticos, como el no respeto del tiempo de supresión del antibiótico administrado, la sobredosificación o su administración sin autorización veterinaria. La presencia del residuo antibiótico en la leche también puede transferirse a los productos que se elaboren con la misma.

En el Reglamento 37/2010 se establecen los Límites Máximos de Residuos (LMRs) de sustancias farmacológicamente activas que se utilizan en medicamentos veterinarios, es decir, se especifica la máxima concentración (mg o μg de compuesto/kg de alimento fresco) de una sustancia química determinada que puede admitirse en un alimento sin que signifique un riesgo para la salud del consumidor. En este reglamento se especifican los LMRs para la leche de distintas especies, pero no para sus productos derivados, como el lactosuero.

Las consecuencias de la presencia de los antibióticos tanto en la leche como en sus productos afectan tanto a la salud pública, a la industria alimentaria, a los ganaderos o al medio ambiente.

Respecto a la salud pública son muchos los estudios que han demostrado que su presencia causa reacciones alérgicas en consumidores hipersensibles (Romano & Demoly, 2007; Ahaduzzaman *et al.*, 2014), la aparición de cepas bacterianas multirresistentes patógenas a los antibióticos, que pueden dificultar la curación o hacerla imposible en animales y humanos (Gimeno & Ortega, 2005). Además también pueden provocar afecciones en el sistema inmune (Wegener *et al.*, 1999), aplasias, ototoxicidad, teratogenidad o carcinogenidad (Epstein *et al.*, 2000).

En la industria alimentaria, la presencia de antibióticos en la leche y sus productos afecta a la elaboración de productos fermentados como el queso o yogur (Perreten & Teuber, 1995). Giraldo *et al.* (2017a) demostraron que durante la fabricación de queso a partir de leche de cabra contaminada con distintos antibióticos, los β -lactámicos eran los antibióticos que más se transferían al lactosuero, por el

contrario, aminoglucósidos, quinolonas y las tetraciclinas, presentaban una mayor susceptibilidad de quedar retenidas en la cuajada.

La detección de antibióticos por parte de las autoridades sanitarias en estos productos conlleva su retirada del mercado y la desconfianza del consumidor, ocasionando pérdidas económicas tanto al sector alimentario como al ganadero.

La presencia de inhibidores en el medio ambiente proveniente de leche, orina o heces con residuos de antibióticos (Kemper, 2008) también pueden llegar a filtrarse a las aguas subterráneas pudiendo llegar a ser consumidas por animales y humanos (Martínez-Carballo *et al.*, 2007).

3. CONTROL DE ANTIBIÓTICOS EN LA LECHE Y DERIVADOS

3.1. Medidas de control

A partir de la publicación del Libro Blanco sobre seguridad alimentaria (2000) la Unión Europea desarrolló el conocido como “paquete de higiene de los alimentos” que reúne los reglamentos de política alimentaria. El Reglamento (CE) 178/2002 recoge los principios generales sobre legislación alimentaria, y de él se fue elaborando la legislación vigente de esta materia: Reglamento (CE) 852/2004 sobre la higiene de los productos alimenticios, Reglamento (CE) 853/2004 sobre la higiene de los alimentos de origen animal, Reglamento (CE) 882/2004 sobre controles oficiales de productos de origen animal y la Directiva sobre Sanidad animal y normas zoonositarias 2002/99/CE.

Para el cumplimiento de la legislación europea en materia de leche y sus productos derivados, el Ministerio de Agricultura, y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente de España desarrolló el Real Decreto 217/2004 donde se regula la identificación y registro de los agentes, establecimientos y contenedores que intervienen en el sector lácteo, además del registro de movimientos de la leche cruda de vaca, con la creación de la base de datos de Letra Q. Esta norma se completó posteriormente en forma del Real Decreto 1728/2007 por el que se establece la normativa básica de control que deben cumplir los operadores del sector lácteo.

En el caso del ganado ovino y caprino lechero, en el Real Decreto 752/2011 se estableció la normativa básica de control que deben cumplir los agentes del sector de la

leche cruda de oveja y cabra por el que también se debían integrar al sistema Letra Q. La última modificación de estas normativas se recoge en el Real Decreto 198/2017.

En este marco legislativo se establece la obligatoriedad de realizar una serie de controles en las explotaciones ganaderas, en los centros lácteos y en los laboratorios de control en la leche cruda. En la Decisión 2002/657/CE se describen y clasifican en dos grupos los métodos que se emplean para el control de antibióticos. Estos pueden ser: métodos cualitativos, que identifican las sustancias basándose en sus propiedades químicas, biológicas o físicas, o métodos cuantitativos, que determinan la cantidad o la fracción de la masa de una sustancia.

A su vez la Directiva 96/23/CE clasifica los métodos de detección pudiendo ser de cribado o de confirmación. Los primeros son métodos que detectan o no, muestras con presencia de antibiótico por encima del LMR y en general son más rápidos y baratos. Por otra parte los de confirmación, se utilizan una vez determinadas las muestras problema con el primer método y proporcionan información total o complementaria que permite identificar y/o cuantificar la sustancia en la muestra a analizar. Las etapas de control, la clasificación y características de los distintos métodos de detección de inhibidores en la leche puede consultarse en la Figura 2.

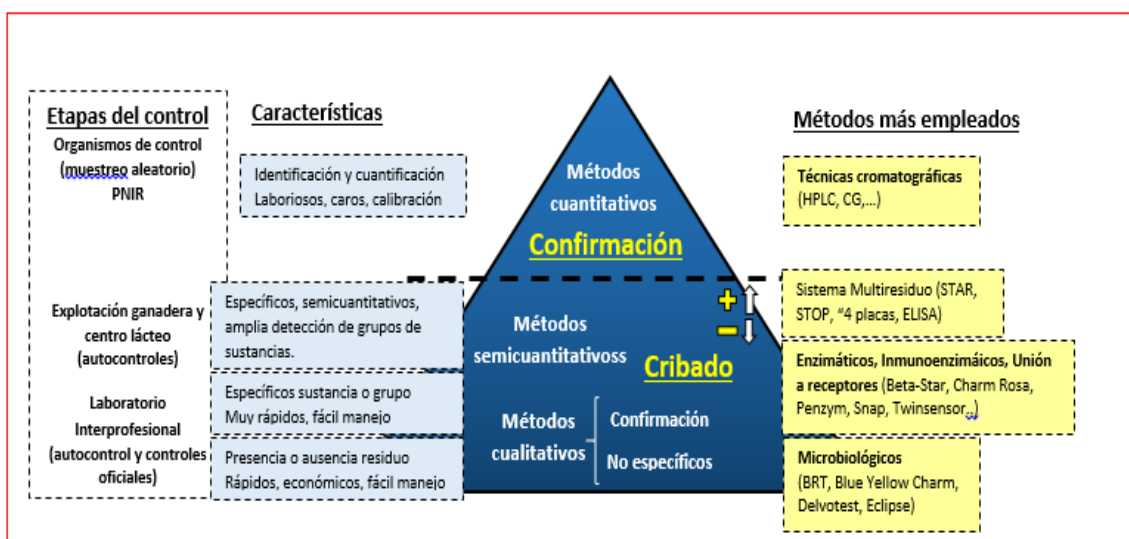


Figura 2. Etapas de control y clasificación y características de los métodos de detección de inhibidores en la leche.

Fuente: Molina et al. (2010).

3.2. Métodos microbiológicos de detección de antibióticos en la leche y derivados

Los métodos microbiológicos son métodos cualitativos que detectan la presencia por encima de los LMRs o su ausencia de los residuos antibióticos en una muestra. Estos métodos son los más empleados a nivel de laboratorios de control de calidad de la leche.

Los métodos microbiológicos de cribado están basados fundamentalmente en pruebas de inhibición de crecimiento de un microorganismo (microorganismo test) a concentraciones de antibióticos por encima del LMR en una muestra. La detección de esta inhibición se revela aprovechando algunas cualidades del microorganismo test mediante indicadores de pH, potencial rédox, bioluminiscencia, etc. (Borràs, 2011). El crecimiento del microorganismo indicará la ausencia o presencia por debajo del LMR del antibiótico, la fase de crecimiento suele acelerarse mediante la incubación a condiciones favorables del microorganismo. El principio de actuación de este método se muestra en la Figura 3.

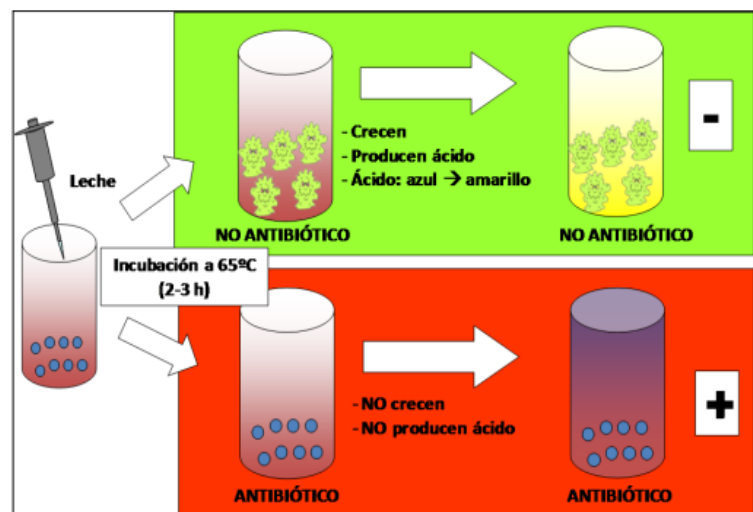


Figura 3. Principio de los métodos microbiológicos de detección de antibióticos en la leche.

Fuente: Borràs (2011).

Entre los microorganismos empleados destaca el *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* para los métodos microbiológicos de uso comercial. Su uso extendido se debe a que tiene un rápido crecimiento a temperaturas altas y una elevada sensibilidad a los antibióticos β -lactámicos. Algunos de estos métodos microbiológicos

son el BRT inhibitor test[®], de CRH Hansen[®], Devoltest[®] de DSM[®] o Eclipse Farm 3G[®] y Eclipse 100 de Zeulab[®].

En general estos métodos microbiológicos de cribado han sido desarrollados para la detección de inhibidores en leche de vaca (Litterio *et al.*, 2007) aunque existen también estudios que los han evaluado para leche de oveja y cabra (Althaus *et al.*, 2003a; Molina *et al.*, 2003; Beltrán *et al.*, 2014b).

3.3. Métodos de receptores proteicos de detección de antibióticos en la leche y derivados

Los métodos de unión a receptores proteicos son métodos cualitativos rápidos (minutos) que permiten una detección más específica de los residuos de antibióticos en las muestras de leche y son métodos muy utilizados en las explotaciones ganaderas y centros lácteos.

Los métodos de unión a receptores se basan en el empleo de receptores específicos de cada grupo de antibióticos, en la mayoría de estos métodos hay una primera fase en la que se pone en contacto la muestra de leche con el receptor proteico produciendo la posible interacción con el antibiótico o antibióticos de la muestra, seguida de una segunda fase en la que a la muestra junto al receptor se añade un medio inmunocromatográfico, comúnmente en forma de tira reactiva. Esta tira contiene una línea control y una o más líneas específicas para el tipo de antibiótico a evaluar. Estas líneas “capturarán” o no a los receptores específicos para el antibiótico en cuestión que no hayan podido interactuar con el antibióticos durante la primera fase (Borràs, 2011). Por lo que si hay presencia de antibiótico por encima del LMR no se producirá coloración o se producirá una coloración menor a la de la línea control de referencia de la línea del antibiótico en cuestión. El procedimiento de este método se muestra en la Figura 4.

Algunos de estos métodos comerciales son: BetaStar Combo[®] de Chr. Hansen Holding A/S[®], ROSA Charm MRL BL/TET[®] de Charm Science INC[®], SNAP[®] de Idexx Laboratories[®] o el TwinSensor[®] de UniSensor[®]. Aunque la lectura de los resultados puede realizarse de manera visual, muchas de estas casas comerciales disponen de lectores fotométricos para hacer más fiable la lectura del resultado.

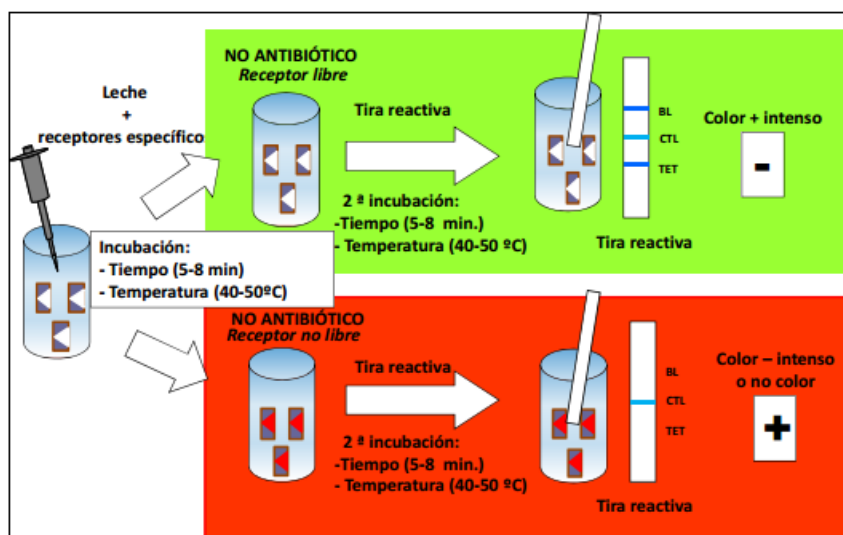


Figura 4. Principio de los métodos de unión a los receptores proteicos para la detección de antibióticos en leche.

Fuente: Borràs (2011).

Al igual que los métodos microbiológicos estos métodos han sido desarrollados principalmente para la leche de vaca, existiendo estudios de validación para la leche de otras especies como la cabra y oveja (Beltrán *et al*, 2014c; Beltrán, *et al.*, 2014a).

3.4 Características de funcionamiento de los métodos la detección de antibióticos.

Para la validación de métodos de detección de antibiótico existe la Decisión 2002/657/CE por la que se aplica la Directiva 96/23/CE en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados. Como complemento a la Decisión, la comunidad de laboratorios de referencia de análisis de residuos han publicado la "Guidelines for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines" (CRLs, 2010) con el objetivo de establecer los requisitos mínimos de validación de métodos de cribado. Según esta guía y para este tipo de métodos, es necesario ejecutar dos fases de verificación. La primera debe llevarse a cabo por el laboratorio de desarrollo del método a validar y la segunda fase debe realizarse en un laboratorio receptor para demostrar que puede aplicarse correctamente. Los parámetros a determinar se encuentran en la Tabla 4.

Tabla 4. Clasificación de los métodos cualitativos en función de las características de funcionamiento.

		Capacidad de detección (CC β)	Límite de decisión (CC α)	Veracidad	Precisión	Especificidad	Robustez/ estabilidad
Métodos cualitativos	S ¹	+	-	-	-	+	+
	E ²	+	+	-	-	+	+

¹S: métodos de cribado. ²E: métodos específicos. +: determinación obligatoria.

Fuente: Decisión 2002/657/CE.

Las características de funcionamiento de los métodos de cribado utilizados en este trabajo, se describen en los apartados siguientes.

- Capacidad de detección (CC β): Según la Decisión 2002/657/CE, es el “contenido mínimo de una sustancia que puede ser detectado, identificado o cuantificado en una muestra, con una probabilidad de error β . El error β es la probabilidad de que la muestra analizada sea realmente no conforme, aunque se haya obtenido una medición conforme (decisión de falso no conforme)”. Para el cálculo del CC β una vez detectada la concentración a partir la cual el método detecta una muestra como positiva a antibiótico (límite de detección), para establecerse la capacidad de detección o CC β debe testarse esa concentración el número de veces que indica la CRLs (Tabla 5), según la Decisión 2002/657/CE el error β , no debe ser mayor al 5%.

Tabla 5. Número de repeticiones basadas en la cercanía de la predicción de la capacidad de detección (CC β) al 95%.

Concentración del LMR	Número de repeticiones	Número de falsos positivos permitidos ($\leq 5\%$)
$\leq 0,5$ LMR	20	1
$> 0,5$ LMR y $< 0,9$ LMR	40	2
$\geq 0,9$ LMR y \leq LMR	60	3
$>$ LMR	20	1

- Especificidad o selectividad: Definida por la Decisión 2002/657/CE como *“la capacidad de un método de distinguir entre el analito que se está midiendo y otras sustancias afines (isómeros, metabolitos, productos de degradación, sustancias endógenas, constituyentes de la matriz, etc.)”*. Para poder calcular este parámetro hay que comprobar si el método califica como positivas muestras que son negativas. Un buen método de cribado debe presentar los niveles más bajos posibles de “falsos positivos”.
- Robustez: La Decisión 2002/657/CE define la robustez como *“la susceptibilidad de un método analítico a los cambios de las condiciones experimentales (...) Deberá indicarse cualquier variación de las condiciones experimentales susceptibles de fluctuación en la práctica (estabilidad de los reactivos, composición de la muestra, pH o temperatura por ejemplo) que puedan afectar a los resultados analíticos”*.

Dado que en los métodos de cribado han sido descritos y validados para la leche de diferentes especies pero no existe validación para el caso del lactosuero es necesario el estudio de las características de funcionamiento de los métodos comerciales de cribado para la detección de los antibióticos de mayor uso en ganado lechero.

II. OBJETIVOS

El objetivo de este Trabajo de Fin de Master ha sido llevar a cabo un estudio de validación de distintos métodos de cribado para la detección de antibióticos en el lactosuero de acuerdo a los criterios de la Decisión 2002/657/CE donde se establecen las características de funcionamiento de métodos de detección de medicamentos veterinarios en alimentos. Los métodos empleados han sido métodos comerciales de tipo microbiológico como el Eclipse Farm 3G[®] acoplado a e-Reader[®] y de tipo de unión a receptores como el TwinSensor[®], 3AminoSensor[®] y QuinoSensor[®] empleados habitualmente en el análisis de la leche.

De una forma más concreta los objetivos han sido:

- Validación del método Eclipse Farm 3G[®] acoplado al e-Reader[®] para detección de antibióticos en lactosuero realizando un experimento previo para establecer la preparación de las muestras, el cálculo del punto de corte (cut-off) y el estudio de las características de funcionamiento del método como capacidad de detección (CC β), especificidad y robustez.
- Validación de los métodos TwinSensor[®], 3AminoSensor[®] y QuinoSensor[®] para la detección de antibióticos betalactámicos, aminoglucosidos y quinolonas respectivamente en el lactosuero calculando la capacidad de detección (CC β) y la especificidad de los métodos.

Con este estudio se pretende responder a la necesidad de disponer de métodos de cribado para la detección de antibióticos en el lactosuero procedente de la elaboración del queso y de este modo poder establecer una estrategia de control para evitar la llegada de antibióticos a través de este subproducto lo que puede implicar un impacto negativo para la seguridad alimentaria, la sanidad animal y/o el medio ambiente.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

Este trabajo se ha realizado en la granja experimental de pequeños rumiantes y en los laboratorios del Departamento de Ciencia Animal de la Universitat Politècnica de València, (Valencia, España).

1. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para la validación de los métodos de detección de antibiótico en lactosuero de cabra se ha seleccionado el método microbiológico Eclipse Farm 3G® acoplado al lector e-Reader® y los métodos de unión a receptores TwinSensor®, 3AminoSensor® y QuinoSensor®, complementados con el lector ReadSensor® que han sido diseñados para la detección de antibióticos en leche. Como el objetivo es realizar la validación en lactosuero de cabra se elaboraron muestras de lactosuero de cabra a partir de leche de tanque recién ordeñada y libre de residuos antibióticos.

Según el tipo de método la guía CRLs establece qué parámetros deben determinarse. Para la validación en estos métodos de cribado se ha realizado:

- Método Eclipse Farm 3G®: un experimento previo para la preparación de las muestras, cut-off, la capacidad de detección (CC β), especificidad y robustez.
- Métodos TwinSensor®, 3AminoSensor®, QuinoSensor®, TyloSensor®: capacidad de detección (CC β) y la especificidad.

Una vez determinadas las características de funcionamiento, se procedió al estudio de la aplicación de estos métodos en 20 lactosueros de cabra procedentes de queserías comerciales para comprobar su idoneidad a nivel de industria láctea.

2. MUESTRAS DE LACTOSUERO

Las muestras de lactosuero de cabra fueron obtenidas a partir de leche de tanque mediante ordeño mecánico, de cabras Murciano-Granadinas a mitad de lactación (entre 60 y 180 días postparto) de la granja experimental de pequeños rumiantes del Departamento de Ciencia Animal de la UPV. Todas las muestras pertenecían a animales sanos que no habían sido tratados con antibióticos, ni habían recibido alimentación medicada ni antes ni durante el tiempo que duró el experimento.

En muestra de leche se midió el pH con un pHmetro (Crison, Barcelona, España) y se separó una alícuota para su análisis en el Laboratorio Interprofesional de la Comunidad Valenciana (LICOVAL) para el análisis del contenido de grasa, proteína y extracto seco (MilkoScan 6000, Foss, Hillerød, Dinamarca), recuento de gérmenes totales (Bactoscan FM, Foss) y de células somáticas en leche de cabra (Fossomatic 5000, Foss), para garantizar que cumplían con los requisitos de composición y calidad higiénica señalados en la norma ISO/IDF N° 183 (2003). Una vez analizadas se procedía a la fabricación del lactosuero.

De cada mezcla de leche se depositó 40 ml en tubos de plástico estéril Falcon a los que se añadieron 25 µl de cuajo (Chymosin >70 %. Suministros Arroyo, Santander, España) (0,65 ml cuajo/l leche) cuando alcanzaban la temperatura de $33^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Tras homogenizar el cuajo en los tubos, se dejaban incubando 30 minutos a $33^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Tras ese tiempo, las cuajadas ya formadas eran cortadas y removidas para favorecer el desuerado y se las dejaba incubando 10 minutos a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Transcurrido el tiempo, se volvían a remover e incubar 5 minutos a 35°C . Finalmente, los tubos con la cuajada se introducían en la centrifugadora (Digicen 21 de Ortoalresa, Madrid, España) 10 minutos a 3000 rpm. A continuación se separó el queso fresco del lactosuero producido mediante un colador.

El queso fresco era desechado y el lactosuero producido se separaba en dos muestras, una de ellas se enviaba a LICOVAL para el análisis de su contenido en grasa, proteína, lactosa, extracto seco, células somáticas o bacteriología, y la otra muestra se congelaba a -18°C para su uso posterior.

3. ANTIBIÓTICOS Y MUESTRAS FORTIFICADAS

Para la validación de los métodos se seleccionaron representantes de las familias de los antibióticos más utilizados en ganadería caprina. Los antibióticos empleados pueden consultarse en la Tabla 6.

Tabla 6. Antibióticos empleados en el estudio.

Sustancia antimicrobiana	Disolvente	Referencia comercial ¹
β-lactámicos:		
Amoxicilina	H ₂ O+ CH ₄ O (50 + 50 v/v)	A8523
Bencilpenicilina	H ₂ O+ CH ₄ O (50 + 50 v/v)	P3032
Cefalexina	H ₂ O+ CH ₄ O (50 + 50 v/v)	C4895
Tetraciclinas:		
Oxitetraciclina	CH ₄ O	O4636
Aminoglucósidos:		
Gentamicina	H ₂ O+ CH ₄ O (50 + 50 v/v)	G3632
Macrólidos:		
Tilosina	CH ₄ O	T627
Quinolonas:		
Enrofloxacin	CH ₄ O+1ml M NaOH	17849-5G-F
Sulfanamidas:		
Sulfatiazol	CH ₄ O	46902

¹ Todos los antibióticos fueron suministrados por Sigma-Aldrich Química, S.A. (Madrid, España).

De cada uno de estos antibióticos se prepararon dos soluciones madre o “stock” con una concentración de 1mg/1ml con su disolvente correspondiente (agua, o metanol y agua al 50% generalmente) siguiendo las indicaciones de la CRLs (CRL, 2010) y teniendo en cuenta el grado de pureza de cada antibiótico indicado por el fabricante.

4. MÉTODO ECLIPSE FARM 3G®

4.1 Protocolo de uso del método

El método Eclipse Farm 3G® acoplado a e-Reader® consiste en un sistema microbiológico de cribado desarrollado para leche de vaca (Mata *et al*; 2016) fabricado por la empresa Zeulab, S.L. (Zaragoza, España) que detecta un amplio espectro de antibióticos en la leche. Este método presenta pequeños tubos individuales con un medio de cultivo nutritivo de agar con esporas de *Geobacillus stearothermophilus* y un indicador ácido-base, el púrpura de bromocresol. El equipo de incubación y el lector de

resultados están integrados en el mismo equipo, el e-Reader® y se muestran en la Figura 5.



Figura 5. Eclipse Farm 3G® junto al e-Reader®.

Para el procedimiento de ensayo se siguieron las indicaciones del fabricante, excepto en el modo de preparación de la muestra. Debido a lo novedoso del método y a su desarrollo para su uso en leche y no en lactosuero, en los primeros ensayos se observó que se generaban gradientes de color anómalos en los tubos con el medio antes y después de su incubación. Considerando que se trata de un método inespecífico, los resultados pueden verse afectados por factores relacionados con la propia composición de la leche, la presencia de inhibidores naturales o elevados recuentos de células somáticas, entre otros, que podrían dar lugar a resultados “falsos positivos” (Althaus et al., 2003b).

Por ello, se decidió hacer un experimento previo para determinar un protocolo de preparación de muestras. En 10 muestras de lactosuero libres de antibiótico diferentes se hicieron los siguientes tratamientos: incubación directa en e-Reader®, difusión a temperatura ambiente durante una hora, calentado (80°C, 10 minutos), centrifugado (3000 rpm, 10 minutos) y centrifugado más calentado (centrifugado a 3000 rpm, 10 minutos más 10 minutos a 80°C). El tratamiento que menores gradientes de color mostraba era el de dejar una hora de difusión la muestra junto al medio antes de la incubación, por lo que fue el tratamiento de elección (los resultados del experimento previo se desarrollan por completo en el punto 2.1 del apartado de Resultados y Discusión).

El procedimiento de ensayo para el uso del método Eclipse Farm 3G® acoplado a e-Reader® es el siguiente: en cada tubo se adiciona 100 µl de la muestra de lactosuero

(fortificada con antibiótico o libre de antibiótico) que se deja difundir una hora a temperatura ambiente. Después, los tubos son lavados con agua destilada 3 veces e inmediatamente son colocados en la gradilla del e-Reader®. Uno de los espacios del e-Reader® se emplea para un tubo con lactosuero control libre de antibiótico para que actúe como referencia para la parada automática del equipo tras la incubación. Esta incubación a 65°C tiene una duración de 2 horas y 30 minutos- 2horas y 45 minutos, que son la temperatura y el tiempo óptimo para que germinen o no, las esporas presentes en el medio según la cantidad o ausencia de antibiótico.

Durante ese tiempo de incubación, el equipo hace lecturas fotométricas periódicas (595 y 650 nm) del color del medio de cada tubo. Los cambios de color son debidos al indicador púrpura de bromocresol presente en el tubo, que se revela haciendo virar el color del medio desde morado a amarillo-verdoso si las esporas del gel agar en ausencia de antibiótico han germinado, crecido y metabolizado el azúcar (lactosa) produciendo un ácido por la fermentación (ácido láctico) que disminuye el pH del medio durante la incubación. El e-Reader® tras el tiempo de incubación muestra un valor en pantalla para cada tubo, que comparándolo con el punto de corte (cut-off) previamente calculado indica si el resultado es positivo o negativo a la presencia de antibióticos. La ventaja del uso de un lector fotométrico es que evita la dificultad que existe para diferenciar visualmente aquellas muestras con antibiótico a concentraciones alrededor del límite de detección (LMR).

4.1.1 Punto de corte (cut-off)

Es necesario el establecimiento de un valor de corte o “cut-off” a partir del cual el equipo considere que una muestra es negativa o positiva según la concentración de antibiótico. Para su cálculo se ha seguido la forma propuesta por *Mata et al.* (2016). 75 muestras de lactosuero de cabra libres de antibiótico fueron analizadas en el e-Reader®. A partir de los valores obtenidos tras su lectura se calculó el promedio de todas ellos, la desviación estándar y el punto de corte se calculó como la suma del promedio más tres veces la desviación estándar. Los valores se expresan expresados en unidades arbitrarias (UA).

4.2 Características de funcionamiento

4.2.1 Capacidad de detección o (CC β)

A partir de las soluciones madre de antibiótico se preparan las muestras fortificadas necesarias para determinar la capacidad de detección o CC β . La capacidad de detección debe estudiarse en al menos 4 tipos de muestra de lactosuero y en dos soluciones stock diferentes del mismo antibiótico (CRL, 2010). Para su cálculo se establecían las siguientes fases:

Se preparan soluciones de lactosuero fortificadas con antibiótico a distintas concentraciones crecientes en torno al límite máximo de residuos (LMR) indicado por el Reglamento 37/2010. El incremento de concentración de antibiótico entre ellas está determinado por la CRLs (CRL, 2010), respetando que la cantidad de antibiótico no superase el 1% de su volumen como recomienda la Federación Internacional de Lechería (FIL, 2014).

La primera concentración detectada como positiva se repetía 5 veces, como recomiendan las normas UNE-EN ISO 13969 y 18330 (ISO/IDF, 2003) para confirmar el límite de detección. Si menos de 3 de las repeticiones eran clasificadas como negativas, se repetía esta fase a la concentración inmediatamente superior.

Finalmente se hacían tantas repeticiones a la concentración del límite de detección como indica la CRLs (CRL, 2010) y que pueden consultarse en la Tabla 5. En total al menos el 95% de las muestras repetidas de las fases dos y tres debían ser positivas.

4.2.2 Especificidad o selectividad

Para determinar la especificidad se siguieron las indicaciones de la CRL respecto a la aparición de casos positivos no causados por residuos de drogas veterinarias (CRLs, 2010). Para ello se calculó la ratio de falsos positivos que podían aparecer durante el análisis de 130 muestras de lactosuero de cabra libres de antibiótico.

4.2.3 Robustez

Teniendo en cuenta que el parámetro que más puede influir en la variación de los resultados es un pH bajo en la muestra (pH < 6,5) para calcular la robustez como

indica la CRLs, primero se analizaron 20 muestras con un pH normal ($\geq 6,5$) de las cuales 10 eran negativas y 10 estaban fortificadas a la concentración de antibiótico de su CC β . Después se analizaron 20 muestras a pH ácido (pH < 6,5) de las cuales 10 eran negativas y 10 estaban fortificadas a la concentración de antibiótico de su CC β como establece la CRLs (CRL, 2010). Se observó su respuesta al método.

5. MÉTODOS DE UNIÓN A RECEPTORES PROTEICOS

5.1 Protocolo de uso de los métodos de unión a receptores

Los métodos de cribado de unión a receptores proteicos TwinSensor[®], 3AminoSensor[®] y QuinoSensor[®], son pruebas rápidas (minutos) en formato de tira reactiva fabricados por la empresa Unisensor[®] (Ougrée, Bélgica). Para su uso es necesario el incubador HeatSensor[®] y aunque la lectura de los resultados puede ser visual, se dispone de un accesorio de lectura fotométrica, el ReadSensor[®]. Los equipos utilizados se presentan en la Figura 6.



Figura 6. Incubador HeatSensor[®] (BIOSAN TDB-100) y lector fotométrico ReadSensor[®] (Small Case APP038).

Cada uno de estos métodos es específico para un grupo o varios de antibiótico, como se especifica a continuación:

- TwinSensor[®] detecta 15 tipos de β -lactámicos y 4 tipos de tetraciclinas.
- 3AminoSensor[®] puede detectar 5 tipos de aminoglucósidos.
- QuinoSensor[®] detecta 11 tipos de (fluoro)quinolonas.

Los métodos utilizados se presentan en la Figura 7.



Figura 7. Métodos TwinSensor[®], 3AminoSensor[®], QuinoSensor[®].

Para todos los tipos de métodos se ha utilizado el mismo protocolo especificado por el fabricante para el caso del lactosuero fresco, en el que no se especifica ninguna preparación de la muestra previa a su análisis, modificándose solamente los tiempos de incubación.

El protocolo de uso del método es el siguiente, se adiciona a los pocillos 200µl de muestra de lactosuero (fortificadas o no por antibiótico) y se mezcla con la punta de la pipeta con los reactivos ya presentes en los pocillos. A continuación, se incuban 3 minutos en el HeatSensor[®]. Una vez pasado este tiempo, se coloca una tira reactiva en los pocillos por el extremo de la esponjita y se deja incubar 6 minutos de nuevo. Pasado el segundo tiempo de incubación, se procede inmediatamente a la lectura visual de las tiras reactivas, se les retira la esponjita y en menos de 10 minutos se realiza la lectura en el equipo fotométrico ReadSensor[®]. El punto de corte de este método considera como muestras positivas aquellas que tienen un valor < a 1,10 de ReadSensor[®]

5.2 Características de funcionamiento del método.

5.2.1 Capacidad de detección (CCβ)

La capacidad de detección se estableció de igual modo que ha sido expuesto en el método Eclipse Farm 3G[®], siguiendo los criterios establecidos en la CRLs (CRL, 2010).

5.2.2 Especificidad o selectividad

Dado la alta especificidad de los métodos de unión a receptores para la detección de uno o varios antibióticos y al alto coste económico del método, en el estudio de la especificidad se han empleado únicamente 50 muestras de lactosuero de cabra sin antibiótico. A partir de su análisis, se calcula la relación entre los resultados “falsos positivos” y la totalidad de las muestras analizadas.

5.2.3 Robustez

Dado que el fabricante ya había realizado una adaptación del método para el análisis del lactosuero, no se considera necesario realizar un estudio de robustez. Las especificaciones del fabricante indican que en caso de que las muestras se encuentren con un $\text{pH} < 6$ se debía incrementar este valor con la adición de NaOH 0.1 M. Además, el fabricante especifica que si en el segundo tiempo de incubación de 6 minutos se observara que la muestra no lograba alcanzar la línea control de la tira reactiva, este tiempo debía incrementarse a 9 o 12 minutos para asegurarse de que la muestra ascendía por toda la tira reactiva. En este estudio, el incremento del segundo tiempo de incubación no fue necesario.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS DE LACTOSUERO

La composición y los valores de pH de las muestras de lactosuero de cabra experimental utilizadas para el estudio de la validación de los métodos de cribado y del lactosuero de cabra utilizado para el estudio de la aplicabilidad de los métodos a nivel de industria láctea se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7. *Composición y pH del lactosuero de cabra experimental y comercial.*

Parámetros	Lactosuero experimental	Lactosuero comercial
	Media ± DS ¹	Media ± DS ¹
Sólidos totales (%)	6,69±0,16	5,95±0,52
Lactosa (%)	4,91±0,10	4,57±0,43
Grasa Bruta (%)	0,68±0,16	0,83±0,29
Proteína (%)	1,09±0,15	1,028±0,23
pH	6,45±0,22	6,11±0,82

¹DS: Desviación estándar

Como puede observarse en la citada Tabla, las muestras de lactosuero de cabra experimental muestran tanto una composición como una calidad comparable a la de otros lactosueros de cabra experimentales (Tabla 1 de la Introducción) y a la de los lactosueros de cabra comerciales analizados, por lo que se considera una matriz adecuada para el estudio de validación de los métodos de cribado. Teniendo en cuenta las normas de la Federación Internacional de la leche (FIL, 2014) para el experimento se escogieron las muestras con un pH > 6,5, y para el estudio de los lactosueros comerciales, los lactosueros comerciales cuyo pH < 6,5 debido al procedimiento de la fabricación de queso (coagulación láctica) se ajustó el pH con NaOH 0,1 M.

2. RESULTADOS DEL MÉTODO ECLIPSE FARM 3G®

2.1 Protocolo de uso del método

Para optimizar las condiciones de preparación de las muestras de lactosuero para su análisis con el método Eclipse Farm 3G® se realizaron diferentes operaciones previas y tras la incubación en el e-Reader® se obtuvieron los resultados expuestos en la Tabla 8.

Tabla 8. Valores del e-Reader® para el experimento de preparación de las muestras de lactosuero.

	Incubación directa	Difusión T ^a ambiente 1 h.	Calentado 80°C /10 min.	Centrifugado o 3000 rpm /10 min.	Centrifugado 3000rpm /10 min. + calentado 80°C/10 min.
Media ±DS ¹	66±21	42±6	43±8	62±15	52±9

¹DS: Desviación estándar

Considerando conjuntamente los resultados obtenidos con 10 lactosueros negativos, libres de antibióticos, mediante el lector e-Reader® y por interpretación visual de los mismos, se puede establecer que el pre-tratamiento más adecuado en muestras de lactosuero para su uso con el test Eclipse Farm 3G® es el de pre-difusión durante una hora a temperatura ambiente. Ya que las muestras de lactosuero sometidas a un tratamiento de pre-difusión mostraron valores menores al correspondiente punto de corte del e-Reader® (62) y la menor desviación estándar. Además, este valor es similar a la respuesta fotométrica del lector para la muestra utilizada como control negativo o muestra de referencia (40). Visualmente, los lactosueros sometidos a dicho pre-tratamiento, no mostraban gradientes de color tras la incubación de las muestras. Consecuentemente, se decidió incluir dicha pre-difusión como parte del protocolo para el análisis de antibióticos en lactosuero mediante el uso del Eclipse Farm 3G® acoplado al lector e-Reader®.

Los tratamientos de calentamiento y la aplicación conjunta de calentamiento y centrifugación sobre las muestras de lactosuero también mejoraban considerablemente la interpretación de los resultados, disminuyendo la intensidad de los gradientes de color generados en el análisis de dicha matriz, pero hay que tener en cuenta que estos

tratamientos son más laboriosos y podrían implicar una demora en la duración de los análisis.

2.2 Punto de Corte (cut-off)

Tras el análisis con el equipo e-Reader[®] de 75 muestras de lactosuero de cabra libres de antibiótico, se obtuvo un valor medio de los resultados equivalente a 41 con una desviación estándar de 7. Asimismo, el punto de corte para las muestras de lactosuero de cabra se calculó como la suma de la media de las muestras negativas y tres veces su desviación estándar, por lo que el valor propuesto de cut-off fue de 62,1, el cual se redondeó a 62, ya que el e-Reader[®] no trabaja con decimales. Los resultados de todas las muestras se presentan en la Figura 8.

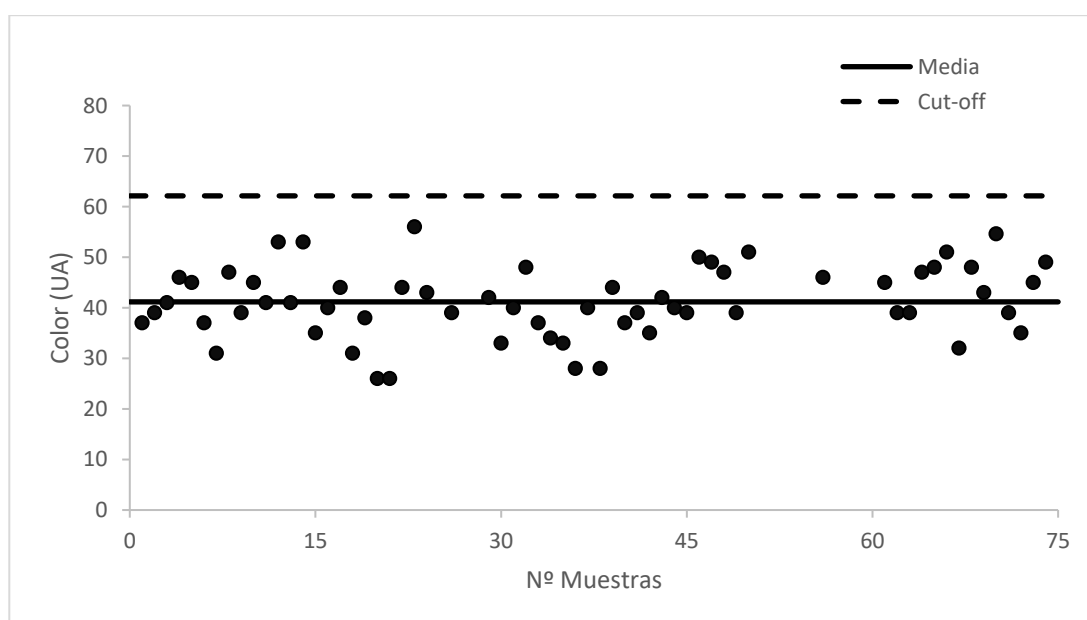


Figura 8. Resultados de la media y del cut-off obtenidos por el e-Reader[®]

El resultado del cut-off (62) obtenido resulta similar al establecido por Giraldo *et al.* 2017b en de leche de oveja y leche de cabra con Eclipse Farm 3G[®] y e-Reader[®] siendo de 63,4 y 63,2 respectivamente. Por lo tanto, el estudio en lactosuero de cabra muestra valores muy similares a los obtenidos para leche de pequeños rumiantes.

Por el contrario, el valor de cut-off en lactosuero de cabra resultó ser superior al indicado por Mata *et al.* (2016) para leche de vaca con el mismo método Eclipse Farm

3G[®] acoplado a e-Reader[®] (54,8). Esta diferencia puede ser debida al diferente número de muestras empleadas y a la diferente composición de las muestras.

2.3 Características de funcionamiento

2.3.1 Capacidad de detección (CC β)

Los resultados del límite de detección y la capacidad de detección del método Eclipse Farm 3G[®] acoplado a e-Reader[®] calculados para cada uno de los antibióticos estudiados en el lactosuero de cabra se muestran en la Tabla 9 y Tabla 10 respectivamente.

Tabla 9. Límite Máximo de Residuos y límite de detección del método Eclipse Farm 3G[®] acoplado a e-Reader[®] de los antibióticos estudiados.

Antibiótico	LMR¹ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LD² ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Media\pmDS³
Amoxicilina	4	4	71 \pm 5
Bencilpenicilina	4	3	107 \pm 15
Cefalexina	100	50-60	63 \pm 18
Oxitetraciclina	100	60-100	68 \pm 12
Gentamicina	100	30-100	72 \pm 4
Tilosina	50	15-20	66 \pm 5
Sulfatiazol	100	20	94 \pm 8
Enrofloxacina	100	1500-2000	56 \pm 21

¹LMR: Límite Máximo de Residuos del Reglamento 37/2010.; ²LD= Límite de detección; ³Media \pm Desviación estándar.

Tabla 10. Límite Máximo de Residuos y capacidad de detección (CC β) del método Eclipse Farm 3G[®] acoplado a e-Reader[®] de los antibióticos estudiados.

Antibiótico	LMR ¹ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	CC β ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Nº de positivos/nº de muestras totales	Media \pm DS ²
Amoxicilina	4	5	20/20	107 \pm 12
Bencilpenicilina	4	3	40/40	117 \pm 24
Cefalexina	100	60	39/40	108 \pm 19
Oxitetraciclina	100	100	60/60	95 \pm 12
Gentamicina	100	100	60/60	94 \pm 13
Tilosina	50	20	19/20	86 \pm 14
Sulfatiazol	100	20	20/20	81 \pm 12
Enrofloxacina	100	2000	20/20	75 \pm 8

¹LMR: Límite Máximo de Residuos del Reglamento CE 37/2010. ²DS: Desviación estándar.

De acuerdo con la Tabla 9, todos los límites de detección obtenidos son inferiores o iguales a sus LMR correspondientes, excepto para la enrofloxacina, cuyo límite de detección (1500-2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$) se encuentra muy por encima de su LMR (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Este alto límite de detección coincide con el de otros estudios de métodos microbiológicos en lactosuero de cabra, como el de Giraldo *et al.* (2017c) en el que el límite de detección del método Eclipse 100[®] para las quinolonas estudiadas, entre las cuales se encontraba la enrofloxacina, también era muy superior (1982 $\mu\text{g}/\text{kg}$) al LMR.

Respecto a la capacidad de detección (CC β) del método Eclipse Farm3G[®] acoplado a e-Reader[®] en lactosuero de cabra, la mayor parte de antibióticos estudiados los CC β calculados se han encontrado a niveles \leq a sus LMRs por lo que para estos antibióticos, el método Eclipse Farm3G[®] acoplado a e-Reader[®] es un método eficaz para la detección en muestras de en lactosuero de cabra. Solamente la amoxicilina y la enrofloxacina han mostrado un CC β mayor al de sus LMR que además en el caso de la amoxicilina está muy cercano al límite permitido (5 vs 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Estos resultados son comparables a los calculados por Giraldo *et al.* (2017a) en lactosuero de leche de cabra

utilizando el método microbiológico Eclipse 100[®], en el que la capacidad de detección del método fue igual para la amoxicilina, inferior para la bencilpenicilina y cefalexina. Por el contrario, el CC β de la oxitetraciclina y de la tilosina se situaban por encima de sus LMR. También en ese estudio se utilizó un método microbiológico específico para la detección de la quinolonas (Equinox[®], Zeulab), pero el CC β que obtuvieron para la enrofloxacin fue superior a su LMR aunque mucho menor (251,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) que al CC β obtenido en este estudio.

Giraldo *et al.*, (2017b) establecieron los CC β para leche de cabra con el método Eclipse 3G[®] acoplado a e-Reader[®] y sus resultados coinciden con los del presente estudio para la bencilpenicilina, inferiores para la amoxicilina, pero son mayores para la cefalexina, sulfatiazol y tilosina aunque todos ellos se sitúan por debajo de sus LMRs. Para la oxitetraciclina y la gentamicina, sus CC β (250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ respectivamente) eran mayores a los LMRs establecidos para estos antibióticos.

Otros autores (Beltrán *et al.*, 2014a) utilizando diferentes test microbiológicos comerciales (BRT MRL[®], Delvotest SP-NT[®], Delvotest DA[®] y Eclipse 100[®]) en leche de cabra obtuvieron, en general, mayores CC β que los calculados en este estudio, por ejemplo para la cefalexina, su CC β para el método BRT MLR[®] estuvo por encima de su LMR, también en la tilosina presentó CC β para los métodos BRT MLR[®], Delvotest SP-NT[®], Delvotest DA[®] y Eclipse 100[®] superiores a los del presente estudio. Además, tanto los residuos de las tetraciclinas como de las quinolonas que estudiaron Beltrán *et al.* (2014a) no pudieron ser detectados a nivel de su LMR por ninguno de los citados métodos microbiológicos.

En los CC β calculados por Mata *et al.*, (2016) utilizando el método Eclipse Farm 3G[®] acoplado a e-Reader[®] en leche de vaca, los valores fueron menores para la amoxicilina, cefalexina y gentamicina que los del presente estudio. En cambio, los CC β para tilosina y sulfatiazol (25 $\mu\text{g} / \text{kg}$ y 50 $\mu\text{g} / \text{kg}$ respectivamente) en su estudio fueron mayores a los indicados en la Tabla 10 para esos mismos antibióticos. Para la oxitetraciclina, obtuvieron un CC β =100 $\mu\text{g} / \text{kg}$, valor ajustado a su LMR, al igual que en este estudio. Hay que resaltar que los valores del e-Reader[®] señalados en leche de vaca eran mucho menores a los obtenidos en lactosuero. Teniendo en cuenta el alto límite

de detección para la enrofloxacin en ese estudio (10000 µg/kg) no decidieron calcular el CCβ para este antibiótico, y aconsejaban complementar este método inespecífico con otro específico para quinolonas para la fase de cribado de muestras de leche.

2.3.2 Especificidad

La especificidad del método Eclipse Farm 3G[®] acoplado a e-Reader[®] calculada a partir del número de falsos positivos, tras el análisis de 130 muestras de lactosuero de cabra libres de antibiótico, fue del 97,7%, siendo el porcentaje de 2,3%.

Este porcentaje de resultados considerados como “falsos positivos” es cercano al porcentaje del 3% indicado por Giraldo *et al.* (2017c) con el método del Eclipse 100[®] en muestras de lactosuero de cabra. En otros estudios con Eclipse Farm 3G[®] en leche de oveja y cabra (Giraldo *et al.* 2017b), el cálculo de los “falsos positivos” fueron muy reducidos (0,5% y 0% respectivamente). También en otros métodos microbiológicos aplicados a la leche de cabra, Beltrán *et al.* (2014b) señalan para el BRT MRL[®] un 1,4%, Devoltest MCS SP-NT[®] 3,1%, Devoltest DA[®] 4,3% y Eclipse 100[®] del 0,6%.

Se considera que el porcentaje de “falsos positivos” en el presente estudio es bajo, y similar al de otros estudios, por lo que la especificidad de este método es alta para el análisis de antibióticos en lactosuero de cabra. La Decisión 2002/657/CE no establece un ratio de falsos positivos mínimo, pero por razones prácticas, se entiende que debe ser lo más bajo posible.

2.3.3 Robustez

Los resultados del método Eclipse Farm3G[®] acoplado a e-Reader[®] de la influencia del pH de las muestras de lactosuero libre de antibióticos tanto en lactosuero a pH normal (>6,5) como a pH ácido (<6,5) mostraban la misma media y desviación estándar, 41±7 clasificando todas las muestras como negativas. Por lo que se entiende que un pH bajo en la muestra de lactosueros libres de antibióticos no produce “falsos positivos”.

También la influencia del pH se ha estudiado a partir de muestras de lactosuero con un pH normal y a un pH ácido fortificadas con antibióticos a la concentración de su CCβ, estos resultados se encuentran en la Tabla 11. Como puede observarse en la Tabla,

los valores medios del e-Reader® en los lactosueros ácidos fortificados con antibiótico disminuyen respecto a los valores del e-Reader® en los lactosueros con pH normal fortificados con antibiótico, calculándose en algunos casos resultados que se han considerado como “falsos negativos”.

Tabla 11. Resultados de la influencia del pH en muestras de suero fortificadas con antibióticos con el método Eclipse Farm 3G® acoplado a e-Reader®.

Antibiótico	CCβ (µg/kg)	Media±DS¹ (pH>6,5)	Media±DS¹ (pH <6,5)	% “Falsos negativos” (pH<6,5)
Amoxicilina	5	107±12	94±16	0
Bencilpenicilina	3	121±21	86±15	0
Cefalexina	60	108±19	100±16	0
Oxitetraciclina	100	95±12	72±10	20
Gentamicina	100	94±13	49±13	80
Tilosina	20	86±14	40±9	100
Sulfatiazol	20	81±12	49±8	80
Enrofloxacina	2000	75±8	35±9	100

¹DS: Desviación estándar

Observando el porcentaje de “falsos negativos”, se aprecia que los lactosueros ácidos no afecta en la detección de antibióticos β-lactámicos (amoxicilina, bencilpenicilina y cefalexina) ya que en ningún caso han aparecido “falsos negativos”. La robustez del método comienza a disminuir en las muestras de lactosuero ácido con un 20% de “falsos negativos” como es el caso de la oxitetraciclina que se incrementa a un 80 % en gentamicina y sulfatiazol, llegando hasta un 100% en la tilosina y la enrofloxacina.

Por lo tanto, considerando que un número mayor del 5% de “falsos negativos” de las muestras de lactosuero ácido invalida el método Eclipse Farm 3G® acoplado a e-Reader® por falta de robustez, este método sólo es válido para los antibióticos β-lactámicos cuando las muestras de lactosuero de cabra tienen un pH<6,5.

Por otra parte, los resultados obtenidos del análisis de 20 sueros comerciales de lactosuero de cabra procedentes de queserías de la Comunitat Valenciana presentaron un valor medio de e-Reader® de 38 ±12, por lo tanto, todos ellos fueron catalogados

como muestras negativas lo que indica la idoneidad del método para el empleo de muestras no solo experimentales sino también comerciales.

3. RESULTADOS DE LOS MÉTODOS DE UNIÓN A RECEPTORES

3.1 Características de funcionamiento

3.1.1 Capacidad de detección (CC β)

Los resultados de los límites de detección de los métodos de unión a receptores TwinSensor[®], 3AminoSensor[®] y QuinoSensor[®] complementados con el lector ReadSensor[®] en lactosuero de cabra se muestran en la Tabla 12.

Como se observa en la Tabla 12, los límites de detección se encuentran por debajo del LMR en el caso de TwinSensor[®] para la amoxicilina y para la bencilpenicilina), lo cual coincide con el calculado por la casa comercial, UniSensor[®] para leche de vaca. En el caso de la oxitetraciclina ,ésta muestra el valor más bajo respecto a su LMR, incluso se encuentra por debajo del límite de detección calculado por UniSensor[®] para leche de vaca (LD=50 $\mu\text{g}/\text{kg}$). En cambio, para la cefalexina, el límite de detección es muy superior a su LMR, coincidiendo esta falta de sensibilidad del kit con el límite calculado para leche de vaca por UniSensor[®] (LD=>750). En el método 3AminoSensor[®] el límite de detección se encuentra por encima del LMR de la gentamicina para lactosuero de cabra. UniSensor[®] para leche de vaca estableció que el límite de detección estaba más ajustado al LMR de la gentamicina (LD=75-100 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Durante el estudio de este antibiótico, se comprobó que la interpretación visual de las muestras se consideraba dudosa positiva a partir de 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y positiva a partir de 80 $\mu\text{g}/\text{kg}$, por lo que es posible que el lector ReadSensor[®] no esté correctamente capacitado para la interpretación de resultados mediante la lectura fotométrica de las tiras en el caso de la gentamicina para el lactosuero de cabra.

Para el método QuinoSensor[®], el límite de detección (Tabla 12) también era menor que su LMR en el lactosuero de cabra. Este límite de detección es mayor que el calculado por UniSensor[®] para leche de vaca (LD=15-20 $\mu\text{g}/\text{kg}$), aunque este cálculo se he realizado de distinta manera a la de este estudio, ya que para UniSensor[®] esta concentración es la suma de dos antibióticos, enrofloxacin y ciprofloxicina.

Tabla 12. Límite Máximo de Residuos y límite de detección de los métodos TwinSensor®, 3AminoSensor® y QuinoSensor®.

Método y antibiótico	LMR ¹ (µg/kg)	LD ²	Media±DS ³
<i>TwinSensor</i> ®			
Amoxicilina	4	2-3	0,68±0,24
Bencilpenicilina	4	3	0,52±0,27
Cefalexina	100	250-500	0,82±0,23
Oxitetraciclina	100	10	0,4±0,21
<i>3AminoSensor</i> ®			
Gentamicina	100	110-160	0,88±0,18
<i>QuinoSensor</i> ®			
Enrofloxacina	100	30-40	0,92±0,09

¹LMR: Límite Máximo de Residuos del Reglamento 37/2010. ²LD: Límite de detección.

³Media±Desviación estándar.

Respecto a la capacidad de detección (CCβ) de los métodos de unión a receptores de antibióticos en el lactosuero de cabra los resultados de la validación se presentan en la Tabla 13.

La capacidad de detección (CCβ) de TwinSensor®, para la amoxicilina se encuentra por debajo de su LMR. Beltrán *et al.* (2014c) en la leche de cabra establecieron con TwinSensor® y otros métodos de unión a receptores como Betastar Combo® y SNAP Betalactam test® el mismo CCβ que el presente estudio para este antibiótico.

Para la bencilpenicilina, TwinSensor® presenta un CCβ de 3 µg/kg en muestras de lactosuero de cabra. Este CCβ es ligeramente superior que el calculado por Beltrán *et al.* (2014c) para leche de cabra en los métodos TwinSensor® y SNAP Betalactam test® (CCβ = ≤2 µg/kg para ambos), pero igual para el método Betastar Combo® (CCβ = 3).

El CC β de la cefalexina para el método TwinSensor[®] en lactosuero de cabra se estableció en 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$, siendo esta concentración el doble que su límite de detección y cinco veces mayor que su LMR, por lo tanto, este método no es adecuado para la detección de cefalexina en lactosuero de cabra a niveles \leq de su LMR. Beltrán et al. (2014c) tampoco pudieron cuantificar su CC β a niveles \leq de su LMR.

Para la oxitetraciclina, la CC β calculado con el método TwinSensor[®] en lactosuero estuvo muy por debajo de su LMR, al igual que calculó Beltrán et al. (2014c) en otros métodos de unión a receptores proteicos para la leche de cabra.

En la leche de vaca, el método TwinSensor[®] ha demostrado capacidades de detección menores o iguales al LMR para todos los antibióticos considerados, siendo un método fiable en la detección de β -lactámicos y tetraciclinas (Perme *et al.*, 2010). Sin embargo, los límites de detección para la cefalexina establecidos por la casa comercial UniSensor[®] son muy superiores al LMR de este antibiótico, no pudiendo considerar el método adecuado para la detección de este antibiótico en la leche de diferentes especies.

En el caso del método 3AminoSensor[®], la capacidad de detección se encuentra por encima del LMR en la gentamicina. Como ya se ha descrito anteriormente, la interpretación visual evaluaba como positivas las muestras a partir de una concentración de 80 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Chabottaux *et al.* (2012) publicaron los resultados para leche de vaca de las capacidades de detección de este método y para este antibiótico, estableciendo su CC β en 75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ mediante la interpretación visual de los resultados.

Por último, para el método QuinoSensor[®], el CC β de la enrofloxacin estuvo por debajo de su límite legal. Existen en el mercado otros métodos de detección de unión a receptores específicos para la detección de enrofloxacin, como el de la casa comercial Charm SCIENCE Inc[®] cuyo método Rosa Enrofloxacin[®], responde a un nivel de sensibilidad del 100% a 8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en leche de vaca; por lo que el método QuinoSensor[®] se mostraría más cercano a su límite legal.

Tabla 13. Límite Máximo de Residuos y capacidad de detección (CC β) de los métodos *TwinSensor*[®], *3AminoSensor*[®] y *QuinoSensor*[®].

Método y antibiótico	LMR ¹ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	CC β ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Nº de positivos/nº de muestras totales	Media \pm DS ²
<i>TwinSensor</i> [®]				
Amoxicilina	4	3	40/40	0,57 \pm 0,10
Bencilpenicilina	4	3	40/40	0,34 \pm 0,14
Cefalexina	100	500	20/20	0,71 \pm 0,12
Oxitetraciclina	100	10	20/20	0,49 \pm 0,22
<i>3AminoSensor</i> [®]				
Gentamicina	100	160	20/20	0,85 \pm 0,15
<i>QuinoSensor</i> [®]				
Enrofloxacina	100	40	20/20	0,78 \pm 0,16

¹LMR: Límite Máximo de Residuos del Reglamento 37/2010.

²DS: Desviación estándar

3.1.2 Especificidad o selectividad

En la Tabla 14 se muestran los resultados del estudio de la especificidad de los métodos *TwinSensor*[®], *3AminoSensor*[®] y *QuinoSensor*[®] respectivamente. Este cálculo se ha realizado a partir de la interpretación tanto visual como con la proporcionada por el equipo lector *ReadSensor*[®], y permite establecer los conocidos como “falsos positivos” tras la medida de 50 muestras de lactosuero de cabra libres de antibiótico.

La especificidad calculada para la detección de β -lactámicos y tetraciclinas con el método *TwinSensor*[®], tanto visual como con el lector fotométrico *ReadSensor*[®], ha sido del 100%, es decir, no se ha observado la presencia de ningún “falso positivo” ni de ninguna muestra con interpretación dudosa durante la lectura de las muestras.

Tabla 14. Resultados del estudio de especificidad para los métodos de unión a receptores proteicos

Lectura	Visual			Lector	
	P	D	N	P	N
<i>TwinSensor</i> [®]					
Clasificación muestras ¹	0	0	50	0	50
Especificidad (%)	100			100	
<i>3AminoSensor</i>					
Clasificación muestras ¹	0	0	50	0	50
Especificidad (%)	100			100	
<i>QuinoSensor</i> [®]					
Clasificación muestras ¹	0	1	49	0	50
Especificidad (%)	98			100	

¹Clasificación de las muestras: P=positiva, D=dudosa, =negativa.

Similares resultados fueron obtenidos por Beltrán *et al.* (2014c), con un 1% de “falsos positivos” para *TwinSensor*[®] en leche de cabra. Estas diferencias podrían estar relacionadas con las diferencias de composición de ambas matrices.

Otros estudios con *TwinSensor*[®] también una alta especificidad, como el estudio Berruga *et al.* (2009) que alcanzaron porcentajes de un 95% de especificidad para la detección de antibióticos β -lactámicos en leche de oveja. Este porcentaje fue más elevado para la leche de vaca, con un 98% de especificidad (Borràs, 2011).

La especificidad calculada para el método *3AminoSensor*[®] ha sido del 100%, tanto en la interpretación visual de resultados como en la interpretación mediante lector, es decir, no ha habido ninguna muestra “falso positiva” durante este estudio para

el lactosuero de cabra. Al no existir resultados aportados por otros autores no se puede realizar la comparación con los análisis de otras matrices.

La especificidad calculada para el método QuinoSensor® ha sido del 98% mediante la interpretación visual de resultados, ya que se únicamente se presentó un resultado dudoso. Aunque la especificidad resultó del 100% con la interpretación mediante el lector ReadSensor®. Esta alta especificidad es comparable con la estudiada para leche de vaca por Borràs (2011) para métodos de unión a receptores en donde el método Rosa Enroflox® (Charm) presento una especificidad del 100%.

Los resultados obtenidos del análisis de 20 sueros comerciales de lactosuero de cabra libre de antibióticos procedentes de queserías de la Comunitat Valenciana con distintos procesados, presentaron los siguientes valores con ReadSensor®, en el método TwinSensor® para β -lactámicos una media y desviación estándar de $1,82 \pm 0,23$ y para tetraciclinas de $2,08 \pm 0,46$. En el caso del método 3AminoSensor®, la media y desviación estándar resulto ser de $2,81 \pm 0,81$ y para el método QuinoSensor®, la media y desviación estándar de $3,55 \pm 0,68$. Teniendo en cuenta que el ReadSensor® considera positivas las muestras con valores $< 0,09$, todos los lactosueros comerciales fueron catalogados como negativos, por lo que sería viable la aplicabilidad de estos métodos a nivel de industria láctea.

V. CONCLUSIONES

De los resultados experimentales del estudio de validación de métodos de cribado para la detección de antibióticos en lactosuero de cabra se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- ✓ El mejor protocolo de preparación de muestras de lactosuero de cabra para el análisis mediante Eclipse Farm 3G® acoplado a e-Reader® es la predifusión de la muestra a temperatura ambiente durante a una hora.
- ✓ Aplicando un punto de corte de 62 UA el método Eclipse Farm 3G acoplado a e-reader ha demostrado ser eficaz como método de cribado para la detección de bencilpenicilina, cefalexina, oxitetraciclina y gentamicina en muestras de lactosuero de cabra no siendo adecuado para la detección de enrofloxacin. También el método ha presentado una especificidad muy elevada (97,7%) aunque se debe tener en cuenta el pH de las muestras de lactosuero.
- ✓ Los métodos de unión a receptores presentan una buena respuesta en el análisis de antibióticos en el lactosuero de cabra. Además en todos los casos los métodos mostraron una alta especificidad

La aplicación de métodos de cribado comerciales en el lactosuero de cabra permitiría establecer una estrategia de control para evitar la llegada de antibióticos a la cadena alimentaria.

VI. BIBLIOGRAFÍA

ABAIGAR A. 2009. "El lactosuero en la alimentación del ganado porcino". ITG ganadero, 13-17.

AHADUZZAMAN M., MAHMUDUK H., ALAM A., ISLAM, A., UDDIN I. "Antimicrobial resistance pattern against Staphylococcus aureus in environmental effluents". Research Journal for Veterinary Practitioners 2:13-16.

AINIA. 2016. "Obtenido el primer bioplástico a partir del suero lácteo excedente de la industria quesera". <<http://www.ainia.es/noticias/prensa/obtenido-el-primer-bioplastico-a-partir-del-suero-lacteo-excedente-de-la-industria-quesera/>> [Consulta: Mayo 2017]

ALMÉCIJA-RODRÍGUEZ M. 2007. "Obtención de lactoferrina bovina mediante ultrafiltración del lactosuero". Tesis Doctoral. Universidad de Granada.

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". Journal of Food Protection, 66: 473-478

ALTHAUS, R.L., MOLINA, M.P., PERIS, C., TORRES, A., FERNÁNDEZ, N., BELTRÁN, M.C. 2003b. "Accuracy of BRT and delvotest microbial inhibitor test as affected by composition of ewe's milk". Journal of Food Protection, 66: 473-478.

ANADÓN A. 2007. "Antibióticos de uso veterinario y su relación con la seguridad alimentaria y salud pública". RACVE-Real Academia de Ciencias Veterinarias España. <<http://racve.es/files/2013/03/2007-02-10-Discurso-ingreso-D.-Arturo-Ram%C3%B3n-Anad%C3%B3n-Navarro.pdf>> [Consulta: Mayo 2017]

ANADÓN A., MARTÍNEZ-LARRAÑAGA M. 1996. "Terapéutica antiinfecciosa porcina". Anaporc, 153:29-49.

BELTRÁN M. C. 2016. "Uso extra-label de antibióticos macrólidos en ganado caprino lechero. Detección de residuos en la leche y en el queso de cabra". Trabajo Fin de Grado. Universidad Politécnica de Valencia.

BELTRÁN M. C., ALTHAUS R.L., BERRUGA M. I., MOLINA A., MOLINA M.P. 2014a. "Detection of antibiotic in sheep milk with receptor-binding assays". *International Dairy Journal*, 34:184-189.

BELTRÁN M.C., BERRUGA M.I., MOLINA A., ALTHAUS R.L., MOLINA M.P. 2014b. "Performance of the current microbial tests for screening antibiotic in sheep and goat milk" *International Dairy Journal*, 41: 13-1

BELTRÁN M. C., BORRÀS M., NAGEL O., ALTHAUS R.L., MOLINA M.P. 2014c. "Validation of receptor-binding assays to detect antibiotics in goat's milk". *Journal of Food Protection*, 77:308-313.

BERRUGA M.I., JASPE A., SAN JOSE C. 2000. "Aprovechamiento de subproductos y tratamiento de los vertidos de quesería". Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. Editorial Comunidad de Madrid, Madrid.

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

BETTIOL W., SILVA R., REIS R. 2008. "Effectiveness of whey against zucchini squash and cucumber powdery mildew". *Scientia Horticulturae*, 11:82-84.

BORRÀS M. 2011. "Evaluación de los métodos de cribado para el control de la presencia de antibióticos en leche cruda de vaca". Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.

CALLEJAS-HERNÁNDEZ, J., PRIETO GARCÍA, F., REYES CRUZ, V., MARMOLEJO SANTILLÁN, Y., MÉNDEZ MARZO M. 2012. "Caracterización físico-química de un lactosuero: potencialidad de recuperación de fósforo". *Acta Universitaria*, 22: 11-17.

CEBRIÁN M., RENTERÍA M., GUTIÉRREZ M., ORIVE M., BALD C., GARCÍA A., ÁLVAREZ R., ÁLVAREZ A., VIOZQUEZ S., ZUFÍA J., MARTÍNEZ S. 2016. "¿Cómo valorizar el lactosuero en pequeñas y medianas queserías?". *IndustriaAmbiente*. 2:53-58.

CHABOTTAUSX V., BONHOMME C., NIVARLET N., MATURELI G., GRANIER B. 2012. "Development of (tri)AminoSensor® dipstick assays: generic versus multiplex dipsticks

for the rapid detection of aminoglycosides in milk". Residues of veterinary drugs in food. Proceedings of the EuroResidue VII Conference, 1,2,3:895-898.

COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS. 2000. Libro Blanco sobre Seguridad Alimentaria. Bruselas, Bélgica.

CRLs. 2010. "Guidelines for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines. Community Reference Laboratories for residues". <http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/lab_analysis_en.htm>

[Consulta: Julio 2017]

CUARTAS B. 2005. "Estudio del proceso de nanofiltración para la desmineralización de lactosuero dulce". Tesis doctoral. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia.

DELOACH B., OYOFO D., CORRIER D., KUBENA R., ZIPRIN R., NORMAN J. 1990. "Reduction of *Salmonella typhimurium* Concentration in Broiler Chickens by Milk or Whey". Avian Diseases, 34:389-392.

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. DOUE-L-1996-80768.

DIRECTIVA 2002/99/CE DEL CONSEJO, de 16 de diciembre de 2002, por la que se establecen las normas zoonitarias aplicables a la producción, transformación, distribución e introducción de los productos de origen animal destinados al consumo humano. DOUE-L-2003-80069.

DECISIÓN DE LA COMISIÓN de 12 de agosto de 2002 por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados (2002/657/CE). DOUE-L-2002-81466.

EFEAGRO. 2012. "El suero de quesería puede utilizarse en la elaboración de cosméticos". Albéitar. <<http://albeitar.portalveterinaria.com/noticia/10680/gestion-y-marketing/el>>

suero-de-queseria-puede-utilizarse-en-la-elaboracion-de-cosmeticos.html> [Consulta: Mayo 2017]

EPSTEIN J., CHONG S., LE N. 2000. "A survey of antibiotic use in dentistry". The Journal of the American Dental Association, 131:1600-1609.

FAOSTAT-FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. 2017. <<http://www.fao.org/faostat/en/#home>> [Consulta: Abril 2017]

FEDNA-FUNDACIÓN ESPAÑOLA PARA EL DESARROLLO DE LA NUTRICIÓN ANIMAL. 2017. <<http://www.fundacionfedna.org/>> [Consulta: Abril 2017]

FIL-FEDERATION INTERNATIONALE DU LAIT. 2014. "Detection of inhibitors and antimicrobial residues in milk and dairy products by screening methods-Guidance on preparation of the test portion". Bulletin of the International Dairy Federation, 471.

FLÓREZ D. 2016. "Evaluación de la eficiencia de un tratamiento biológico aerobio mediante el uso de las bacterias *Pseudomona putida*, *Pseudomona mendocina* y *Hafnia alvei*, como alternativa de tratamiento para vertimientos líquidos de una industria láctea de la ciudad de Manizales". Trabajo de Grado. Universidad Nacional Abierta y a Distancia UNAD.

GIMENO O., ORTEGA C. 2005. "Antibióterapia y Salud Pública Veterinaria; Desarrollo de microorganismos resistentes, mecanismos de resistencia y estrategias para el uso prudente de antibióticos". Seminario: A problemática dos resíduos medicamentosos e contaminantes em produção animal e Saúde Pública. Évora, Portugal.

GIRALDO J. 2014. "RETENCIÓN DE ANTIBIÓTICOS EN LA ELABORACIÓN DE QUESO DE LECHE DE CABRA". Trabajo Fin de Carrera. Universidad de Valencia.

GIRALDO J., ALTHAUS R., BELTRÁN M.C., MOLINA M.P. 2017a "Antimicrobial activity in cheese whey as an indicator of antibiotic drug transfer from goat milk". International Dairy Journal., 69:40-44.

GIRALDO J., CABIZZA R., SANZ D., MATA L., MOLINA M. P. 2017b. "Performance of Eclipse Farm test coupled with e-Reader for screening of antibiotics in sheep and goat

milk". Conference: Innovation for sustainability in sheep and goats. NEIKER-Tecnalia, IAMZ-CIHEAM, Proyecto H2020 iSAGE. Vitoria, España.

GIRALDO J., NAGEL O., ALTHAUS R.L., BELTRÁN M.C., MOLINA M.P. 2017c. "Validación del método microbiológico eclipse 100 para la detección de antibióticos en lactosuero de cabra" Conference: XLII Congreso Nacional·XVIII Congreso Internacional. SEOC, Salamanca, España.

GONZÁLEZ M. 1996. "The biotechnological utilization of cheese whey: A review". *Bioresource Technology*, 57:1-11.

GUERRERO W., CASTILLA-HERNÁNDEZ P., CÁRDENAS-MEDINA K., GÓMEZ-ALDAPA C., CASTRO-ROSAS J. 2012. "Degradación anaerobia de dos tipos de lactosuero en reactores UASB". *Tecnología química*, 32:99-106.

GUTIÉRREZ M., ORIVE M., RENTERÍA M., CEBRIÁN M., PINEDA., GARCÍA A. 2014. "Aprovechamiento integral del lactosuero generado en el sector lácteo proyecto Valorlact". XII Congreso Nacional de Medio Ambiente CONAMA. Madrid. España.

HERNÁNDEZ F. 2015. "Producción de biogás con suero de queso". Ed.Francisco M. Hernández.

HERNÁNDEZ-ROJAS M., VÉLEZ-RUÍZ J. 2014. "Suero de leche y su aplicación en la elaboración de alimentos funcionales". Tesis de Maestrante. Universidad de las Américas Puebla.

INLAC-ORGANIZACIÓN INTERPROFESIONAL LÁCTEA. 2017. <<http://www.inlac.es/>> [Consulta: Abril 2017]

ISO/IDF. 2003. "Milk and milk products - Guidelines for a standardized description of microbial inhibitor test". IDF Standard, Nº 183. Ed. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica.

KEMPER N. 2008. "Review: Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment". *Ecological Indicators*, 8: 1-13.

- LEY 22/2011, de 28 de julio, de residuos y suelos contaminados. BOE-A-2011-13046.
- LLANES N., GOZZINI M. 2013. "Alimentación líquida en ganado porcino". XXIX Curso de especialización FEDNA, 149-169.
- LITTERIO N. J., CALVINHO, L. F., FLORES M. M., TARABLA, H. D., BOGGIO, J. C. 2007. "Microbiological screening test validation for detection of tylosin excretion in milk of cows with low and high somatic cell counts". *Journal of veterinary medicine. A, Physiology, pathology, clinical medicine*, 54: 30 - 35.
- LLANOS G. 2002. "Determinación de residuos antibióticos en la leche fresca que consume la población de Cajamarca". *Revista Amazónica de Investigación Alimentaria*. 2: 35-43.
- LÓPEZ-DÍAZ E. 2014. "Estudios preliminares sobre la utilización del suero lácteo como alimento líquido en cabras". Trabajo Fin de Master. Universidad de Córdoba.
- MACWAN S., DABHI B., PARMAR S. & APARNATHI K. 2016. "Whey and its Utilization". *International Journal of Current Microbiology and applied Science*, 5:134-155.
- MADUREIRA A., PEREIRA., TRUSZKOWSKA K., GOMES A., PINTADO M., MALCATA F. 2005. "Survival of probiotic bacteria in a whey cheese vector submitted to environmental conditions prevailing in the gastrointestinal tract". *International Dairy Journal*, 15:921-927.
- MAPAMA – MINISTERIO DE AGRICULTURA Y PESCA, ALIMENTACIÓN Y MEDIO AMBIENTE. 2005. "Guía de Mejores Técnicas Disponibles en España del sector lácteo". Editorial Centro de Publicaciones, Secretaría General Técnica, Ministerio de Medio Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. Leganés, España.
- MAPAMA – MINISTERIO DE AGRICULTURA Y PESCA, ALIMENTACIÓN Y MEDIO AMBIENTE (2017). < <http://www.mapama.gob.es/es/>> [Consulta: Abril 2017]
- MARTÍNEZ-CARBALLO E., GONZÁLEZ-BARREIRO C., SCHARF S., GANS O. 2007. "Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria". *Environmental pollution*, 148:570-579.

MATA L., SANZ D., RAZQUIN P. 2016. "Performance of Eclipse Farm Test Coupled to e-Reader for Antibiotic Residues Detection in Raw Milk". Food Analytical Methods. 9:519-527.

MATTOS C. 2015. "Valorización del lactosuero". Alimentos hoy, 23:7-20.

MENZIES P., RAMANOON S. 2001. "Mastitis of sheep and goats". The veterinary CLINICS OF North America. Food animal practice, 17:333-358.

MOLINA M.P., BERRUGA M. I., MOLINA A., 2010. "La presencia de residuos de antibióticos en la leche de oveja: Medidas de control y métodos de detección". Small Ruminant Research, 11: 13-22.

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

PARRA-HUERTAS A. 2009. "Lactosuero: importancia en la industria de los alimentos". Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín, 62: 4967-4982.

PERME T., MANJA B., KSENIJA G., ANDREJ K. 2010. "Validation of TwinsensorBT screening test for the detection of β -lactams and tetracyclines in milk, and comparison to Delvotest[®] SP-NT". Slovenian Veterinay Research; 47: 97-106

PERRETEN V., TEUBER M. 1995 "Antibiotic resistant bacteria in fermented dairy products- a new challenge for ewe milk cheese?". Residues of antimicrobial drugs and other inhibitors in milk. IDF Special Issue 9505 Ed. International Dairy Federation. Bruselas Bélgica.

PINEDA-QUIROGA C., ATXAERANDIO R., RUÍZ R., GARCÍA-RODRÍGUEZ A. 2015. "Suplementación con lactosuero en polvo y concentrado en Dietas de iniciación de broilers: efectos sobre el rendimiento productivo". AIDA XVI Jornadas sobre Producción Animal, 1:269-271.

REAL DECRETO LEGISLATIVO 1/2001, de 20 de julio, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Aguas. BOE-A-2001-14276.

REAL DECRETO 217/2004, de 6 de febrero, por el que se regulan la identificación y registro de los agentes, establecimientos y contenedores que intervienen en el sector lácteo, y el registro de los movimientos de la leche. BOE-A-2004-3065.

REAL DECRETO 1728/2007, de 21 de diciembre, por el que se establece la normativa básica de control que deben cumplir los operadores del sector lácteo y se modifica el Real Decreto 217/2004, de 6 de febrero, por el que se regulan la identificación y registro de los agentes, establecimientos y contenedores que intervienen en el sector lácteo, y el registro de los movimientos de la leche. BOE-A-2008-823.

REAL DECRETO 752/2011, de 27 de mayo, por el que se establece la normativa básica de control que deben cumplir los agentes del sector de leche cruda de oveja y cabra. BOE-A-2011-9995.

REAL DECRETO 198/2017, de 3 de marzo, por el que se modifican el Real Decreto 1728/2007, de 21 de diciembre, por el que se establece la normativa básica de control que deben cumplir los operadores del sector lácteo y se modifica el Real Decreto 217/2004, de 6 de febrero, por el que se regulan la identificación y registro de los agentes, establecimientos y contenedores que intervienen en el sector lácteo, y el registro de los movimientos de la leche, el Real Decreto 752/2011, de 27 de mayo, por el que se establece la normativa básica de control que deben cumplir los agentes del sector de leche cruda de oveja y cabra, el Real Decreto 1528/2012, de 8 de noviembre, por el que se establecen las normas aplicables a los subproductos animales y los productos derivados no destinados al consumo humano, y el Real Decreto 476/2014, de 13 de junio, por el que se regula el registro nacional de movimientos de subproductos animales y los productos derivados no destinados al consumo humano. BOE-A-2017-2780.

REGLAMENTO (CE) nº 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 28 de enero de 2002, por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria. DOUE-L-2002-80201.

REGLAMENTO (CE) nº 852/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, relativo a la higiene de los productos alimenticios. DOUE-L-2004-81035.

REGLAMENTO (CE) nº 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal. DOUE-L-2004-81036.

REGLAMENTO (CE) nº 882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004, sobre los controles oficiales efectuados para garantizar la verificación del cumplimiento de la legislación en materia de piensos y alimentos y la normativa sobre salud animal y bienestar de los animales. DOUE-L-2004-81110

REGLAMENTO (CE) No 470/2009 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 6 de mayo de 2009 por el que se establecen procedimientos comunitarios para la fijación de los límites de residuos de las sustancias farmacológicamente activas en los alimentos de origen animal, se deroga el Reglamento (CEE) no 2377/90 del Consejo y se modifican la Directiva 2001/82/CE del Parlamento Europeo y del Consejo y el Reglamento (CE) nº 726/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo. DOUE- L-2009-81089.

REGLAMENTO (UE) nº 37/2010 de la Comisión de 22 de diciembre de 2009 relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere a los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal. DOUE-L-2010-80044.

REGLAMENTO DE EJECUCIÓN (UE) 2016/560 de la Comisión, de 11 de abril de 2016, por el que se aprueba la sustancia básica lactosuero con arreglo al Reglamento (CE) nº 1107/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo a la comercialización de productos fitosanitarios, y se modifica el anexo del Reglamento de Ejecución (UE) nº 540/2011 de la Comisión. DOUE-L-2016-80649.

RODRÍGUEZ-ESTÉVEZ V., MATA-MORENO. 2007. "El suero de quesería, recurso ganadero". Fertilidad de la tierra: revista de agricultura ecológica, 31:12-15.

ROMANO A., DEMOLY P. 2007. "Recent avances in the diagnosis of drug allergt". Current opinión in allergy and clinical inmunollogy, 7:299-303.

SÁNCHEZ DE RIVA C. 2006. "¿Antibióticos,ayer, hoy y mañana...?". Química Viva. 2:63-77.

SHARIATMADAR F., FORBES J. 2010. "Performance of broiler chickens given whey in the food and/or drinking wáter". British Poultry Science, 46:498-505.

VALENCIA E., RAMÍREZ, M. 2009. "La industria de la leche y la contaminación del agua". Elementos, 16:27-31.

VAN DE VOORDE, I., GOIRIS E., SYRYN E., VAN DEN BUSSCHE G. 2014. "Evaluation of the cold-active *Pseudoalteromonas haloplanktis* β -galactosidase enzyme for lactose hydrolysis in whe permeate as primary step of D-tagatose production" Process Biochemistry, 49:2134-2140.

VAN WINSEN R., LIPMAN R., BIESTERVELD S., URLING B., SNIJDERS J., VAN KNAPEN. 2001. "Mechanism of *Salmonella* reduction in fermented pig feed". Journal of the Science of Food and Agriculture, 81:342-346.

VILLAR A. 2005. "Situación y perspectivas de la gestión de los sueros de quesería generados en Cantabria". CIFA Centro de Investigación y Formación Agrarias, Consejería de Ganadería, Agricultura y Pesca y Gobierno de Cantabria. <http://www.cifacantabria.org/Documentos/2005_Sueros_de_queseria.pdf>

[Consulta: Abril 2017]

WALZEM R., DILLARD C., GERMAN J. 2002. "Whey componentes: millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: what we know and what we may be overlooking". Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 42:353-375.

WEGENER H., AARESTRUP F., GERNER-SMIDT P., BAGER F. 1999. "Transfer of antibiotic resistant bacteria from animals to man". Acta Veterinaria Scandinavica Supplementum, 92:51-57.

