



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Departamento de Ciencia Animal

TESIS DOCTORAL

Evaluación de los métodos de cribado para el control de la presencia de antibióticos en la leche cruda de vaca

Presentada por:
Milagro Borràs Llopis

Dirigida por:
María Pilar Molina Pons
Rafael Lisandro Althaus

Julio 2011

Trabajo financiado por el Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino
(Estudios 51.07, 29.08 y 31.08) y la Generalitat Valenciana (A-08/08)

**M^a PILAR MOLINA PONS CATEDRATICA DE UNIVERSIDAD DEL
DEPARTAMENTO DE CIENCIA ANIMAL DE LA UNIVERSIDAD
POLITECNICA DE VALENCIA**

Y

**RAFAEL LISANDRO ALTHAUS PROFESOR DEL DEPARTAMENTO
DE CIENCIAS BASICAS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
VETERINARIAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
(REPUBLICA ARGENTINA)**

INFORMAN:

Que la Tesis Doctoral titulada “Evaluación de los métodos de cribado para el control de la presencia de antibióticos en la leche cruda de vaca” ha sido realizada por Dña. Milagro Borràs Llopis en el Departamento de Ciencia Animal bajo su dirección y que, una vez revisado y comprobado el trabajo, consideran que reúne los requisitos necesarios para la obtención del grado de Doctor por lo que autorizan su presentación.

Y para que así conste firman el presente informe en Valencia treinta de mayo de dos mil once

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento

A mi directora Pilar Molina por el apoyo depositado en la realización de esta Tesis. Por su dedicación y esfuerzo durante todos estos años. Por introducirme en el increíble mundo de la investigación. Sin ti no hubiera sido posible.

A mi codirector de Tesis, Rafael Althaus, por sus consejos y ayuda a pesar de la distancia. Sin ti tampoco hubiera sido posible.

A los fabricantes y distribuidores de los métodos BRT AiM (Analytik in Milch Produktions-und Vertrieb, Munich, Alemania), CMT Copan (Copan, Brescia, Italia), Delvotest (DSM Food Specialties, Delf, Holanda), Eclipse 50 y 100 (Zeu-Inmunotec S.A., Zaragoza), Penzym y Beta Star (UCB Bioproducts, Braine-L'Alleud, Bélgica), Rosa Charm (Charm Sciencies, Lawrence, Massachusetts), Snap (IDEXX Laboratoires Inc., Westbrook) y Twinsensor (Unisensor, Lieja, Bélgica), a todos ellos por el apoyo técnico recibido.

A Antonio Torres gracias por confiar siempre en mi trabajo.

A Mari Carmen Beltrán por su infatigable ayuda y transmitirme tanta ilusión.

A Marta Roca por estar presente y por su apoyo desde el principio en cada proyecto.

Gracias a todos mis compañeros María, Vero, Pau, Elena, Marta, Elisa, Yolanda, Fernando, Salva y Tamara por vuestra compañía y afecto durante tantas horas en el departamento.

A mis hermanos (a todos y cada uno), a mis padres y a Juan por su apoyo, siempre incondicional.

Gracias a todos

RESUMEN

El control de residuos de sustancias antimicrobianas en productos de origen animal, entre los que se encuentra la leche, es de gran importancia, ya que pueden ocasionar problemas al consumidor (alergias, trastornos digestivos, resistencias a medicamentos, etc.) y, además, causar interferencias en la fabricación de productos lácteos ocasionando graves pérdidas económicas en la industria láctea.

Por ello, resulta conveniente establecer un adecuado sistema de control de la presencia de residuos de aquellos antimicrobianos más utilizados en el ganado vacuno lechero, mediante métodos eficaces y prácticos que pueden ser utilizados en las explotaciones ganaderas y centros lácteos, y así evitar su llegada al consumidor.

Debido a la diversidad de métodos analíticos disponibles en el mercado para la detección de antibióticos se planteó el estudio de la selectividad y sensibilidad de los métodos microbiológicos y específicos más utilizados en la etapa de cribado.

En el estudio de selectividad se emplearon 14 métodos (7 microbiológicos y 7 específicos) y se analizaron, por triplicado, 100 muestras de leche procedentes de animales no tratados con ningún medicamento. La selectividad obtenida para los métodos microbiológicos fue muy elevada: BRT AiM (99%), Blue Yellow (100%), CMT Copan (100%), Delvotest MCS Accelerator (98%), Delvotest SP-NT (98%), Eclipse 50 (99%) y Eclipse 100 (99%) y no presentó diferencias significativas entre los métodos. También la selectividad calculada para los métodos específicos alcanzó valores elevados: Beta Star (97%), Delvo XP (99%), Rosa MRL BL (100%), Rosa TET (99%), Snap BL y Snap TET (100%) y Twinsensor BL (100%) y Twinsensor TET (98%) que no presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$), mientras que el método Penzym fue el único en el que la selectividad resultó más baja (82%) con un elevado porcentaje de resultados dudosos y estadísticamente fue diferente al resto de métodos específicos.

En cuanto a la sensibilidad se calculó utilizando muestras de leche, procedentes de la mezcla de 30 animales individuales. Se ensayaron 20 sustancias antimicrobianas y se estudiaron a tres concentraciones distintas (0,5 LMR, LMR y 2 LMR), aunque en algunos casos se ensayaron diferentes concentraciones (LMR, 2 LMR y 4 LMR o 0,25 LMR, 0,5 LMR y LMR) dependiendo de la proximidad de los límites de detección de los métodos a los Límites Máximos de Residuos (LMRs) de cada antibiótico. Se analizaron 30 repeticiones de cada concentración para los métodos microbiológicos y 10 repeticiones para los específicos.

Los métodos microbiológicos presentaron, en general, una sensibilidad elevada para los antibióticos betalactámicos a una concentración equivalente a sus LMRs. En el caso de los métodos específicos a betalactámicos, los resultados fueron variables según el método y la molécula ensayada. Sin embargo la sensibilidad de estos métodos fue elevada al LMR para la penicilina G, cefalexina, cefalonio, cefoperazona, ceftiofuro y ceftiofur.

Para los otros grupos de antimicrobianos estudiados (aminoglucósidos, macrólidos, quinolonas y tetraciclinas), los métodos microbiológicos no fueron capaces de detectar ninguna de las sustancias estudiadas al LMR, excepto en algunos casos como la neomicina con el BRT AiM, Blue Yellow y Delvotest SP-NT que presentaron una sensibilidad del 100% al LMR.

En cuanto a los métodos específicos a tetraciclinas, todos los métodos ensayados (Rosa TET, Snap TET y Twinsensor) presentaron una sensibilidad del 100% para la detección de oxitetraciclina al LMR (100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) aunque el Rosa TET y el Snap TET obtuvieron esta sensibilidad a una concentración equivalente a 0,5 LMR (50 $\mu\text{g}/\text{Kg}$). También la gentamicina y enrofloxacin fueron analizadas por sus correspondientes métodos específicos (Snap Gentamicin, Equinox y Rosa Enrofloxacin) con una sensibilidad en todos los casos del 100% al Límite Máximo de Residuos.

A partir de los resultados de sensibilidad obtenidos se aplicó el Análisis Multivariante de Conglomerados (Cluster) y el Análisis por Componentes Principales (PCA). Los resultados obtenidos mostraron que los métodos microbiológicos BRT AiM, Blue Yellow, CMT Copan, Delvotest MCS Accelerator, Delvotest SP-NT, Eclipse 50 y Eclipse 100 presentaron un comportamiento similar respecto a los resultados de sensibilidad, lo mismo ocurre con los métodos específicos Beta Star, Twinsensor, Delvo XP, Rosa MRL BL y Snap BL.

También con los resultados de sensibilidad obtenidos y las frecuencias de uso de las sustancias antimicrobianas más empleadas en el tratamiento del ganado vacuno lechero se han establecido distintas agrupaciones entre los métodos de cribado, para poder recomendar una combinación de métodos que permita garantizar el mayor espectro en la detección de antimicrobianos en la leche. A partir de los resultados se evidencia que no existe un único método que pueda cubrir la detección de la totalidad de los antibióticos. Así, con la aplicación de un método microbiológico se logra detectar entre el 51,3-70,4% de los antibióticos. Por otro lado, los métodos receptores proteicos a betalactámicos solo llegan a detectar entre el 29,7-54,6% de los antibióticos utilizados. Además, la utilización de dos métodos de cribado de forma simultánea “microbiológico-específico betalactámicos” no mejora notablemente la frecuencia de moléculas a detectar (65,8-71,5%) en comparación con los métodos microbiológicos, pero permite un control más eficiente, al efectuar dos controles por cada muestra de leche.

La incorporación de un método específico para la detección de residuos de tetraciclinas en leche a las combinaciones de “microbiológico-específico betalactámicos” permite incrementar el porcentaje de cobertura de antibióticos en leche entre el 68,1-73,8%. Además, la incorporación en forma periódica de controles de gentamicina (5,7%) con el método Snap Gentamicin y enrofloxacin (2,3%) con los métodos Equinox o Enroflox permitiría llegar a detectar hasta el 81,8% de los antibióticos empleados en España para el ganado vacuno lechero.

Por otra parte, ante los escasos estudios sobre el efecto de los factores metodológicos relacionados con la toma de muestras de la leche, se planteó la necesidad de realizar una evaluación sobre la influencia del tiempo de refrigeración y la presencia de azidiol sobre la respuesta de algunos de los métodos microbiológicos de cribado más utilizados en los laboratorios de control para la detección de los residuos de antibióticos en la leche.

En este estudio se emplearon 12 concentraciones de amoxicilina, ampicilina, penicilina G y oxitetraciclina que se analizaron a las 0, 24, 48 y 72 horas de refrigeración a 4 °C, con el objetivo de calcular las pérdidas relativas de actividad antimicrobiana para cada antibiótico, a partir de los límites de detección de los métodos, en muestras de leche sin conservante y con azidiol. Los resultados indicaron, de forma general, que la pérdida de actividad antimicrobiana (PAA) de los antibióticos aumentó con el tiempo de refrigeración de las muestras de leche y que estas pérdidas fueron menores en las muestras de leche con azidiol. Por ello, en caso de recurrir a la refrigeración de las muestras de leche sería conveniente el uso de azidiol y realizar el análisis dentro de las primeras 48 horas de su llegada al laboratorio.

Dada la importancia de la presencia de residuos de medicamentos en la leche para la Seguridad Alimentaria, se considera conveniente continuar con los estudios sobre métodos de detección de antibióticos y desarrollar metodologías analíticas con espectros de detección más amplios para el análisis de otros grupos de antimicrobianos, como los aminoglucósidos, macrólidos y quinolonas, dada su elevada frecuencia de uso en vacuno lechero y la falta de sensibilidad de los actuales métodos de cribado. La implementación del actual sistema de control con otros métodos específicos o con métodos de mayor espectro de detección permitiría establecer una estrategia analítica más conveniente que la aplicada en la actualidad.

RESUM

El control de residus de substàncies antimicrobianes en productes d'origen animal, entre els quals es troba la llet, és de gran importància, ja que poden ocasionar problemes al consumidor (al·lèrgies, trastorns digestius, resistències a medicaments, etc.) i, a més, causar interferències en la fabricació de productes lactis ocasionant greus pèrdues econòmiques en la indústria làctia.

Per això, resulta convenient establir un adequat sistema de control de la presència de residus d'aquells antimicrobians més utilitzats en el bestiar boví lleter mitjançant mètodes eficaços i pràctics que poden ser emprats en les explotacions ramaderes i centres lactis, i així evitar-ne l'arribada al consumidor.

A causa de la diversitat de mètodes analítics disponibles al mercat per a la detecció d'antibiòtics es va plantejar l'estudi de la selectivitat i sensibilitat dels mètodes microbiològics i específics més utilitzats en l'etapa de cribatge.

En l'estudi de selectivitat es van utilitzar 14 mètodes (7 microbiològics i 7 específics) i es van analitzar per triplicat 100 mostres de llet, procedents d'animals no tractats amb cap medicament. La selectivitat obtinguda per als mètodes microbiològics va ser molt elevada: BRT AiM (99%), Blue Yellow (100%), CMT Copan (100%), Delvotest MCS Accelerator (98%), Delvotest SP-NT (98%), Eclipse 50 (99%) i Eclipse 100 (99%), que no hi van presentar diferències significatives. També la selectivitat calculada per als mètodes específics va aconseguir valors elevats: Beta Star (97%), Delvo XP (99%), Rosa MRL BL (100%), Rosa TET (99%), Snap BL i Snap TET (100%), Twinsensor BL (100%) i Twinsensor TET (98%) que no hi van presentar diferències significatives ($p < 0,05$), mentre que el mètode Penzym va ser l'únic en què la selectivitat va resultar més baixa (82%) amb un elevat percentatge de resultats dubtosos i estadísticament fou diferent respecte de la resta de mètodes específics.

Quant a la sensibilitat es va calcular utilitzant mostres de llet, procedents de la barreja de 30 animals individuals. Es van assajar 20 substàncies antimicrobianes i es s'estudiaren a tres concentracions distintes (0,5 LMR, LMR i 2 LMR), encara que en alguns casos es van assajar diferents concentracions (LMR, 2 LMR i 4 LMR o 0,25 LMR, 0,5 LMR i LMR) depenent de la proximitat dels límits de detecció dels mètodes amb els Límits Màxims de Residus (LMRs) de cada antibiòtic. Es van analitzar 30 repeticions de cada concentració per als mètodes microbiològics i 10 repeticions per als específics.

Els mètodes microbiològics presentaren, en general, una sensibilitat elevada per als antibiòtics betalactàmics en una concentració equivalent als seus LMRs. En el cas dels mètodes específics a betalactàmics, els resultats van ser variables segons el mètode i la molècula assajada. No obstant això, la sensibilitat d'aquests mètodes va ser elevada al LMR per a la penicil·lina G, cefalexina, cefaloni, cefoperazona, ceftiofura i ceftiofur.

Per als altres grups d'antimicrobians estudiats (aminoglicòsids, macròlids, quinolines i tetraciclins), els mètodes microbiològics no van ser capaços de detectar cap de les substàncies estudiades al LMR, excepte en alguns casos puntuals com la neomicina per a la qual el BRT AiM, Blue Yellow i Delvotest SP-NT al LMR van presentar una sensibilitat del 100% al LMR.

Quant als mètodes específics a tetraciclins, tots els mètodes assajats (Rosa TET, Snap TET i Twinsensor) presentaren una sensibilitat del 100% per a la detecció d'oxitetraciclina al LMR (100 µg/Kg) encara que el Rosa TET i el Snap TET obtingueren aquesta sensibilitat en una concentració equivalent a 0,5 LMR (50 µg/Kg). També la gentamicina i enrofloxacina van ser analitzades pels seus corresponents mètodes específics (Snap Gentamicin, Equinox i Rosa Enrofloxacin) amb una sensibilitat en tots els casos del 100% a una concentració equivalent al Límit Màxim de Residus.

A partir dels resultats de sensibilitat obtinguts s'aplicà l'Anàlisi Multivariant d'Aglomerats (cluster) i l'Anàlisi per Components Principals (PCA). Els resultats obtinguts van mostrar que els mètodes microbiològics BRT AiM, Blue Yellow, CMT Copan, Delvotest MCS Accelerator, Delvotest SP-NT, Eclipse 50 i Eclipse 100 presentaren un comportament semblant respecte als resultats de sensibilitat, el mateix ocorre amb els mètodes específics Beta Star, Twinsensor, Delvo XP, Rosa MRL BL i Snap BL.

També amb els resultats de sensibilitat obtinguts i les freqüències d'ús de les substàncies antimicrobianes més emprades en el tractament del bestiar boví lleter s'han establert distintes agrupacions entre els mètodes de cribatge, per a poder recomanar una combinació de mètodes que permeti garantir el major espectre en la detecció d'antimicrobians a la llet. A partir dels resultats s'evidencia que no hi ha un únic mètode que pugui cobrir la detecció de la totalitat dels antibiòtics. Així, amb l'aplicació d'un únic mètode microbiològic s'aconsegueix detectar entre el 51,3- 70,4% dels antibiòtics. D'altra banda, els mètodes receptors proteïcs betalactàmics només arriben a detectar entre el 29,7-54,6% dels antibiòtics utilitzats. A més, la utilització de dos mètodes de cribatge de forma simultània "microbiològic-específic betalactàmics" no millora notablement la freqüència de molècules a detectar (65,8-71,5%) en comparació amb els mètodes microbiològics, però permet un control més eficient, en efectuar dos controls per cada mostra de llet.

La incorporació d'un mètode específic per a la detecció de residus de tetraciclins en llet a les combinacions de "microbiològic-específic" permet incrementar el percentatge de cobertura d'antibiòtics en llet entre un 68,1-73,8%. A més, la incorporació en forma periòdica de controls de gentamicina (5,7%) amb el mètode Snap Gentamicin i enrofloxacina (2,3%) amb els mètodes Equinox o Enroflox permetria arribar a detectar fins al 81,8% dels antibiòtics emprats a Espanya per al bestiar boví lleter.

D'altra banda, davant dels escassos estudis sobre l'efecte dels factors metodològics relacionats amb la presa de mostres de la llet, es va plantejar la necessitat de realitzar una avaluació sobre la influència del temps de refrigeració i la presència d'azidiol sobre la resposta d'alguns dels mètodes microbiològics de cribatge més utilitzats als laboratoris de control per a la detecció dels residus d'antibiòtics en la llet.

En aquest estudi es van emprar 12 concentracions d'amoxicil·lina, ampicil·lina, penicil·lina G i oxitetraciclina que es van analitzar a les 0, 24, 48 i 72 hores de refrigeració a 4°C, amb l'objectiu de calcular les pèrdues relatives d'activitat antimicrobiana per a cada antibiòtic, a partir dels límits de detecció dels mètodes, en mostres de llet sense conservant i amb azidiol. Els resultats van indicar, de forma general, que la pèrdua d'activitat antimicrobiana (PAA) dels antibiòtics augmentà amb el temps de refrigeració de les mostres de llet i que aquestes pèrdues van ser menors en les mostres de llet amb azidiol. Per això, en cas de recórrer a la refrigeració de les mostres de llet seria convenient l'ús d'azidiol i realitzar l'anàlisi dins de les primeres 48 hores de la seua arribada al laboratori.

Donada la importància de la presència de residus de medicaments en la llet per a la Seguretat Alimentària, es considera convenient continuar amb els estudis sobre mètodes de detecció d'antibiòtics i desenvolupar metodologies analítiques amb espectres de detecció més amplis per a l'anàlisi d'altres grups d'antimicrobians, com els aminoglicòsids, macròlids i quinolines, donada la seua elevada freqüència d'ús en boví lleter i la falta de sensibilitat dels actuals mètodes de cribatge. La implementació de l'actual sistema de control amb altres mètodes específics o amb mètodes de major espectre de detecció permetria establir una estratègia analítica més convenient que l'aplicada en l'actualitat.

ABSTRACT

The control of residues of antimicrobial substances in products of animal origin such as milk, is highly relevant because it can cause problems to the consumer (allergies, digestive disorders, resistance to medicines, etc.). Moreover, it can result in interferences in the manufacture of dairy products causing serious economic losses in the dairy industry.

Therefore, it is necessary to establish an adequate system to control the presence of the most common residues of antimicrobials used in dairy cows, thus preventing them from reaching the consumer. This control should be based on efficient and practical methods which can be used in animal houses and dairy centres.

Due to the diversity of available analytical methods on the market to detect antibiotics, a specificity and sensitivity study of the most commonly used microbiological and specific methods in the screening stage was conducted.

Fourteen methods (7 microbiological and 7 specific) were used in the assessment. One hundred milk samples from non-treated animals were analysed in triplicate. The specificity obtained for the microbiological methods was high: BRT AiM (99%), Blue Yellow (100%), CMT Copan (100%), Delvotest MCS Accelerator (98%), Delvotest SP-NT (98%), Eclipse 50 (99%), and Eclipse 100 (99%), showing no significant differences among methods. The specificity calculated for the specific methods also reached high values: Beta Star (97%), Delvo XP (99%), Rosa MRL BL (100%), Rosa TET (99%), Snap BL and Snap TET (100%), Twinsensor BL (100%) and Twinsensor (98%), showing no significant differences among them ($p < 0.05$), whereas the Penzym method showed the lowest specificity (82%) with a high number of doubtful results and was statistically different from the other methods.

Method sensitivity was calculated using milk samples from a pool of 30 individual animals. Twenty antimicrobial substances were tested at three concentrations (0.5 MRL, MRL and 2 MRL), though in some cases, these concentrations differed (MRL, 2 MRL and 4 MRL or 0.25 MRL, 0.5 MRL, and MRL), depending on the proximity of the limits of detection of the methods with the Maximum Residues Limits (MRLs) of each antibiotic. Thirty repetitions were tested per concentration for the microbiological methods, and 10 repetitions for the specific methods.

In general, microbiological methods presented a high sensitivity to detect betalactam antibiotics at MRL equivalent concentration. Results from the specific methods to betalactams varied depending on the method and the tested molecule. Nevertheless, the sensitivity of these methods was high at MRL for the molecules of penicillin G, cephalixin, cefalonium, cefoperazone, cefquinome, and ceftiofur.

For the rest of antimicrobial groups (aminoglycosides, macrolides, quinoline, and tetracyclines), microbiological methods did not detect any of the substances studied at the MRL, except for neomycin, where BRT AiM, Blue Yellow, and Delvotest SP-NT methods presented a sensitivity of 100 %.

As regards the specific methods to analyse tetracyclines, all the tested methods (Rosa MRL TET, Snap TET, and Twinsensor) showed a sensitivity of 100% for the detection of oxitetracycline at MLR (100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$). Rosa TET and SNAP TET, however, presented this sensitivity at 0.5 MLR (50 $\mu\text{g}/\text{Kg}$). Gentamicin and enrofloxacin were analysed using the corresponding specific methods (Snap Gentamicin, Equinox, and Rosa Enrofloxacin) showing a sensitivity of 100 % in all the cases at a concentration equivalent to the Maximum Residues Limit concentration.

Multivariate cluster analysis and Principal Component Analysis (PCA) was applied to the sensitivity results. The obtained results showed that the microbiological methods BRT AiM, Blue Yellow, CMT Corner, Delvotest MCS Accelerator, Delvotest

SP-NT, Eclipse 50, and Eclipse 100 presented similar sensitivity results, the same as for the specific methods Thread, Twinsensor, Delvo XP, Rosa MRL BL, and Snap BL.

Clustering of the results of sensitivity and the frequencies of use of the antimicrobial substances most commonly used in dairy cattle was applied to recommend a combination of methods that can guarantee the major spectrum in the detection of antimicrobials in milk. These results indicate that there is no single method which can detect the whole range of antibiotics, i.e. using microbiological methods only, it is possible to detect between 51.3 and 70.4 % of antibiotics. On the other hand, protein receptor models can only detect between 29.7 and 54.6 % of the antibiotics used. In addition, the use of two simultaneous screening methods "betalactam microbiological-specific" did not improve the detection frequency of molecules (between 65.8 and 71.5 %) compared with microbiological methods. Nevertheless, the use of simultaneous screening methods resulted in an efficient control, with two controls per milk sample.

The incorporation of a specific method for the detection of residues of tetracyclines in milk to the combinations of "betalactam microbiological-specific" can increase the percentage of coverage of antibiotics in milk between 68.1 and 73.8 %. Furthermore, the periodic incorporation of gentamicin controls (5.7 %) with the Snap Gentamicin method, and enrofloxacin (2.3 %) with Equinox or Enroflox methods would detect up to 81.8 % of the antibiotics used in Spanish dairy cattle.

In addition, due to the lack of research studies on the effect of methodological factors related with milk sampling, the evaluation of the influence of the time of refrigeration and the presence of acidiol on the response of some of the microbiological screening methods most commonly used in control laboratories for the detection of the residues of antibiotics in milk, was conducted.

In this study, twelve concentrations of amoxicillin, ampicillin, penicillin G, and oxitetracycline were used, which were analysed after 0, 24, 48 and 72 hours of refrigeration at 4°C. The objective was to calculate the relative losses of antimicrobial activity for each antibiotic, based on the detection limits of each method, using milk samples without preservative and with acidiol. Results indicated that antibiotic loss of antimicrobial activity (AAL) increased with time of refrigeration of milk samples and those losses were the lowest in milk samples containing acidiol. Therefore, when milk is refrigerated, the use of acidiol is recommended as well as its analysis within the first 48 hours of its arrival at the laboratory.

Given the implications of the presence of residues of medicines in milk for Food Safety, further studies which deal with detection methods of antibiotics are necessary. Moreover, analytical methodologies with wide spectra of detection for the analysis of other antimicrobial groups such as aminoglycosides, macrolides and quinolones should be developed, given their high frequency of use in dairy cattle and the lack of sensitivity of the current screening methods. To establish a more convenient analytical strategy than that presently used, other specific methods or methods with a wide spectrum of detection should be established in the current control system.

ÍNDICES

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. UTILIZACIÓN DE ANTIMICROBIANOS EN PRODUCCIÓN ANIMAL.....	1
1.1. Consideraciones previas.....	1
1.2. Conceptos generales y clasificación de los antimicrobianos.....	2
1.3. Tratamientos empleados en ganado vacuno lechero.....	4
1.3.1. Principales procesos patológicos del ganado vacuno lechero.....	4
1.3.2. Frecuencia de uso de antimicrobianos empleados en ganado vacuno lechero	6
2. PRESENCIA DE RESIDUOS DE ANTIMICROBIANOS EN LA LECHE.....	13
2.1. Origen de la presencia de residuos de antimicrobianos en la leche.....	13
2.2. Frecuencia de la presencia de residuos de antimicrobianos en la leche.....	15
2.3. Efectos de la presencia de residuos de antimicrobianos en la leche.....	17
3. CONTROL DE LA PRESENCIA DE ANTIMICROBIANOS EN LA LECHE.....	19
3.1. Consideraciones previas.....	19
3.2. Límites Máximos de Residuos.....	20
3.3. Planes de control.....	22
3.3.1. Sistema de gestión de la calidad y trazabilidad de la leche en España.....	22
3.3.2. Estrategia de control de los residuos de antibióticos en la leche.....	25
3.3.3. Toma de muestras de leche para controles de calidad.....	27
4. MÉTODOS DE DETECCIÓN DE ANTIMICROBIANOS EN LA LECHE.....	29
4.1. Generalidades.....	29
4.2. Clasificación de los métodos de detección de antimicrobianos.....	29
4.3. Métodos de cribado para la detección de antimicrobianos en la leche.....	31
4.3.1. Métodos microbiológicos.....	31
4.3.2. Métodos específicos (cualitativos de confirmación).....	34
4.4. Criterios para la validación de los métodos analíticos.....	38
4.4.1. Generalidades.....	38
4.4.2. Límite de detección o capacidad de detección CCB.....	40
4.4.2.1. Generalidades.....	40
4.4.2.2. Límites de detección de los métodos microbiológicos.....	43
4.4.2.3. Límites de detección de los métodos específicos.	51
4.4.3. Sensibilidad.....	53
4.4.3.1. Generalidades.....	53
4.4.3.2. Sensibilidad de los métodos microbiológicos.....	54
4.4.3.3. Sensibilidad de los métodos específicos.....	56
4.4.4. Selectividad.....	57
4.4.4.1. Generalidades.....	57
4.4.4.2. Selectividad de los métodos microbiológicos.....	57
4.4.4.3. Selectividad de los métodos específicos.....	58
4.5. Influencia de factores relacionados con la toma de muestras sobre la respuesta de los métodos de detección de antibióticos en la leche.....	60
4.5.1. Influencia del conservante en las muestras de leche	60
4.5.2. Influencia de la refrigeración de las muestras de leche.....	62
II. OBJETIVOS.....	65

III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	67
1. PRIMER ESTUDIO: Evaluación de los métodos de detección de residuos de antimicrobianos en la leche de vaca.....	67
1.1. Diseño experimental.....	67
1.2. Muestras de leche.....	67
1.3. Sustancias antimicrobianas.....	69
1.4. Métodos analíticos.....	70
1.4.1. Métodos microbiológicos.....	70
1.4.1.1. Brilliant Black Reduction Test MRL (BRT MRL).....	70
1.4.1.2. Blue Yellow.....	71
1.4.1.3. Delvotest SP-NT.....	72
1.4.1.4. Delvotest MCS Accelerator.....	72
1.4.1.5. Eclipse 100.....	73
1.4.1.6. Eclipse 50.....	74
1.4.2. Métodos específicos (cualitativos de confirmación).....	75
1.4.2.1. Equinox.....	75
1.4.2.2. Penzym.....	76
1.4.2.3. Beta Star.....	77
1.4.2.4. Delvo-X-Press.....	78
1.4.2.5. Rosa Charm (Beta-Lactam MRL, TET y Enroflox).....	78
1.4.2.6. Snap (BETA-LACTAM, New TETRA Test Kit y Gentamicin).....	79
1.4.2.7. Twinsensor.....	80
1.5. Análisis estadístico.....	81
2. SEGUNDO ESTUDIO: Estrategia analítica para la detección de residuos de antimicrobianos en la leche de vaca.....	82
2.1. Diseño experimental.....	82
2.2. Muestras de leche.....	82
2.3. Sustancias antimicrobianas.....	82
2.4. Métodos analíticos.....	82
2.5. Análisis estadístico.....	83
2.5.1. Análisis estadístico mediante la técnica de Análisis Multivariante de Conglomerados (Cluster).....	83
2.5.2. Análisis estadístico mediante el Análisis por Componentes Principales (PCA)..	84
2.5.3. Cálculo del porcentaje de detección de antibióticos a partir de las frecuencias de uso en España.....	85
3. TERCER ESTUDIO: Influencia de los factores relacionados con la toma de muestras sobre la respuesta de los métodos microbiológicos de detección de antibióticos en la leche de vaca	86
3.1. Diseño experimental.....	86
3.2. Muestras de leche.....	87
3.3. Sustancias antimicrobianas.....	88
3.4. Métodos microbiológicos.....	88
3.5. Análisis estadístico.....	90
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	91
1. PRIMER ESTUDIO: Evaluación de los métodos de detección de residuos de antimicrobianos en la leche de vaca.....	91

1.1. Selectividad de los métodos.....	91
1.1.1. Métodos microbiológicos.....	91
1.1.2. Métodos específicos (cualitativos de confirmación).....	93
1.2. Sensibilidad de los métodos.....	96
1.2.1. Antibióticos betalactámicos.....	97
1.2.1.1. Métodos microbiológicos.....	97
1.2.1.2. Métodos específicos (cualitativos de confirmación).....	101
1.2.2. Otros antibióticos no betalactámicos.....	107
1.2.2.1. Métodos microbiológicos.....	108
1.2.2.2. Métodos específicos (cualitativos de confirmación).....	112
1.3. Comparación de la sensibilidad de los métodos con el Límite Máximo de Residuos (LMR) de antibióticos en la leche.....	114
1.3.1. Antibióticos Betalactámicos.....	114
1.3.1.1. Métodos microbiológicos.....	114
1.3.1.2. Métodos específicos (cualitativos de confirmación).....	115
1.3.2. Otros antibióticos no betalactámicos.....	116
2. SEGUNDO ESTUDIO. Estrategia analítica para la detección de residuos de antimicrobianos en la leche de vaca.....	117
2.1. Análisis estadístico mediante la técnica de Análisis Multivariante de Conglomerados (Cluster).....	117
2.1.1. Análisis cluster para las moléculas de antibióticos.....	117
2.1.2. Análisis cluster para los métodos de cribado.....	120
2.2. Análisis estadístico mediante la técnica de Análisis por Componentes Principales (PCA).....	122
2.2.1. Métodos microbiológicos.....	122
2.2.2. Métodos específicos (cualitativos de confirmación).....	124
2.3. Porcentajes de cobertura de los métodos de cribado en la detección de los antibióticos utilizados en España en el ganado vacuno lechero	125
3. TERCER ESTUDIO: Influencia de los factores relacionados con la toma de muestras sobre la respuesta de los métodos microbiológicos de detección de antibióticos en la leche de vaca.....	132
3.1. Penicilinas.....	132
3.1.1. Amoxicilina.....	132
3.1.2. Ampicilina.....	142
3.1.3. Penicilina G.....	150
3.2. Oxitetraciclina.....	157
V. CONCLUSIONES.....	165
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	169

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación de los diferentes agentes antimicrobianos.....	3
Cuadro 2. Frecuencia de uso de familias de antimicrobianos en tratamientos de otras patologías diferentes a la mamitis del ganado vacuno lechero.....	10
Cuadro 3. Frecuencia de uso de sustancias antimicrobianas en tratamientos de otras patologías diferentes a la mamitis del ganado vacuno lechero.....	11
Cuadro 4. Frecuencia total de uso de antibióticos en el tratamiento de las principales patologías del ganado vacuno lechero.....	12
Cuadro 5. Presencia de residuos de antibióticos en la leche en diferentes países.....	16
Cuadro 6. Límites Máximos de Residuos de antimicrobianos para la leche de vaca.....	21
Cuadro 7. Características de los métodos microbiológicos de cribado más utilizados en la detección de antibióticos en España.....	33
Cuadro 8. Características de los métodos específicos o de confirmación cualitativa más utilizado en la detección de antibióticos en España.....	35
Cuadro 9. Características de funcionamiento que deben determinarse para la validación de métodos analíticos.....	38
Cuadro 10. Límites de detección ($\mu\text{g}/\text{kg}$) para sustancias antimicrobianas indicadas por los fabricantes para los métodos microbiológicos	44
Cuadro 11. Límites de detección ($\mu\text{g}/\text{Kg}$) de sustancias antimicrobianas calculadas por diferentes autores para el método Brilliant Reduction Test (BRT).....	47
Cuadro 12. Límites de detección ($\mu\text{g}/\text{Kg}$) de sustancias antimicrobianas calculadas por diferentes autores para el método Delvotest.....	49
Cuadro 13. Límites de detección ($\mu\text{g}/\text{Kg}$) para sustancias antimicrobianas indicados por los fabricantes para los métodos específicos	52
Cuadro 14. Características de las sustancias antimicrobianas empleadas en el estudio sobre la sensibilidad de los métodos de cribado.....	69
Cuadro 15. Sustancias antimicrobianas y concentraciones empleadas en el estudio de la influencia de los factores relacionados con la toma de muestra sobre la respuesta de los métodos microbiológicos.....	89
Cuadro 16. Resultados del análisis de muestras de leche de vacas procedentes de animales no tratados mediante los métodos microbiológicos.....	91
Cuadro 17. Resultados del análisis de muestras de leche de vacas procedentes de animales no tratados mediante los métodos específicos para betalactámicos.....	93
Cuadro 18. Frecuencia (%) y de test chi-cuadrado (χ^2) de los resultados de los métodos específicos con muestras de leche procedentes de animales no tratados.....	95
Cuadro 19. Resultados del análisis de muestras de leche de vaca procedentes de animales no tratados mediante los métodos específicos para tetraciclinas.....	96
Cuadro 20. Resultados del análisis de muestras de leche de vaca procedentes de animales no tratados mediante los métodos específicos para quinolonas y gentamicina	96
Cuadro 21. Sensibilidad (%) de los métodos microbiológicos para la detección de antibióticos betalactámicos.....	98
Cuadro 22. Sensibilidad (%) de los métodos específicos para la detección de antibióticos betalactámicos.....	103
Cuadro 23. Sensibilidad (%) de los métodos microbiológicos para la detección de antibióticos no betalactámicos (neomicina y tilosina).....	108

Cuadro 24. Sensibilidad (%) de los métodos microbiológicos para la detección de antibióticos no betalactámicos.....	111
Cuadro 25. Sensibilidad (%) de los métodos específicos para la detección de oxitetraciclina.....	112
Cuadro 26. Sensibilidad (%) de los métodos específicos para la detección de enrofloxacin y gentamicina.....	113
Cuadro 27. Resultados del procedimiento de aglomeración de las sustancias antimicrobianas según los diferentes métodos ensayados.....	118
Cuadro 28. Resultados del procedimiento de aglomeración de los métodos de cribado según los resultados de sensibilidad a los LMRs.....	120
Cuadro 29. Cargas de las variables para los dos primeros componentes principales en los métodos microbiológicos	123
Cuadro 30. Cargas de las variables para los dos primeros componentes principales en los métodos específicos.....	124
Cuadro 31. Porcentaje de cobertura de métodos microbiológicos empleados en la detección de antibióticos en leche.....	126
Cuadro 32. Porcentaje de cobertura de métodos específicos empleados en la detección de antibióticos en leche.....	127
Cuadro 33. Porcentaje de cobertura de posibles combinaciones de dos métodos que presentan diferente base analítica.....	129
Cuadro 34. Valores de chi-cuadrado (χ^2) y probabilidad (p) de los factores de variación de la respuesta de los métodos microbiológicos para la detección de amoxicilina en la leche.....	132
Cuadro 35. Ecuaciones de predicción de la respuesta de los métodos microbiológicos para la detección de amoxicilina en la leche.....	133
Cuadro 36. Efecto del tiempo de refrigeración y la interacción entre tiempo de refrigeración y azidiol sobre los métodos microbiológicos en el análisis de muestras de leche con amoxicilina.....	136
Cuadro 37. Efecto del tiempo de refrigeración y del azidiol sobre los resultados positivos (%) de los métodos microbiológicos en el análisis de muestras de leche con amoxicilina.....	139
Cuadro 38. Valores de chi-cuadrado (χ^2) y probabilidad (p) de los factores de variación de la respuesta de los métodos microbiológicos para la detección de ampicilina en la leche.....	143
Cuadro 39. Ecuaciones de predicción (χ^2) de la respuesta de los métodos microbiológicos para la detección de ampicilina en la leche.....	143
Cuadro 40. Efecto del tiempo de refrigeración, azidiol y la interacción entre tiempo de refrigeración y azidiol sobre los métodos microbiológicos en el análisis de muestras de leche con ampicilina.....	146
Cuadro 41. Efecto del tiempo de refrigeración y del azidiol sobre los resultados positivos (%) de los métodos microbiológicos en el análisis de muestras de leche con ampicilina.....	148
Cuadro 42. Valores de chi-cuadrado (χ^2) y probabilidad (p) de los factores de variación de la respuesta de los métodos microbiológicos para la detección de penicilina G en la leche.....	150
Cuadro 43. Ecuaciones de predicción de la respuesta de los métodos microbiológicos para la detección de penicilina G en la leche.....	151

Cuadro 44. Efecto del tiempo de refrigeración y la interacción entre tiempo de refrigeración y azidiol sobre los métodos microbiológicos en el análisis de muestras de leche con penicilina G.....	153
Cuadro 45. Efecto del tiempo de refrigeración y del azidiol sobre los resultados positivos (%) de los métodos microbiológicos en el análisis de muestras de leche con penicilina G.....	155
Cuadro 46. Valores de chi-cuadrado (χ^2) y probabilidad (p) de los factores de variación de la respuesta de los métodos microbiológicos para la detección de oxitetraciclina en la leche.....	158
Cuadro 47. Ecuaciones de predicción de la respuesta de los métodos microbiológicos para la detección de oxitetraciclina en la leche.....	158
Cuadro 48. Efecto del tiempo de refrigeración, azidiol y la interacción entre tiempo de refrigeración y azidiol sobre los métodos microbiológicos en el análisis de muestras de leche con oxitetraciclina.....	161
Cuadro 49. Efecto del tiempo de refrigeración y del azidiol sobre los resultados positivos (%) de los métodos microbiológicos en el análisis de muestras de leche con oxitetraciclina.....	162

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Frecuencia de tratamientos con sustancias antimicrobianas de diferentes patologías del ganado vacuno lechero.....	5
Figura 2. Frecuencia de uso de antibióticos empleados en formulaciones farmacéuticas de productos veterinarios para el tratamiento de la mastitis.....	7
Figura 3. Frecuencia de uso de sustancias antimicrobianas en el tratamiento de la mastitis del ganado vacuno lechero.....	8
Figura 4. Causas de la presencia de inhibidores en la leche.....	14
Figura 5. Causas de la presencia de residuos de antibióticos en la leche relacionados con los tratamientos de la mastitis.....	15
Figura 6. Esquema de las diferentes etapas implicadas en el sistema de gestión de la trazabilidad de la leche cruda de vaca.....	23
Figura 7. Etapas de control en la detección de antibióticos en la leche.....	25
Figura 8. Diagrama de la realización de la prueba de detección de residuos de antibióticos en explotaciones ganaderas y centros lácteos.....	27
Figura 9. Principio de los métodos microbiológicos de detección de antibióticos en la leche.....	32
Figura 10. Principio del método enzimático Penzym de detección de antibióticos en la leche.....	36
Figura 11. Principio de los métodos de unión a receptores proteicos de detección de antibióticos en la leche.....	37
Figura 12. Modelo de curva dosis-respuesta para el cálculo del límite de detección de los métodos de cribado	41
Figura 13. Perfil de detección de métodos analíticos para diferentes sustancias antimicrobianas.....	42
Figura 14. Diseño experimental del estudio de sensibilidad de los métodos de detección de residuos de antimicrobianos en la leche.....	68
Figura 15. Procedimiento analítico del método microbiológico BRT AiM.....	71
Figura 16. Procedimiento analítico del método microbiológico Blue Yellow.....	71
Figura 17. Procedimiento analítico del método microbiológico Delvotest SP-NT.....	72
Figura 18. Procedimiento analítico del método microbiológico Delvotest MCS Accelerator.....	73
Figura 19. Procedimiento analítico del método microbiológico Eclipse 100.....	74
Figura 20. Procedimiento analítico del método microbiológico Eclipse 50.....	74
Figura 21. Procedimiento analítico del método microbiológico Equinox.....	76
Figura 22. Procedimiento analítico del método enzimático Penzym.....	76
Figura 23. Procedimiento analítico del método de unión a receptores proteicos Beta Star.....	77
Figura 24. Procedimiento analítico del método de unión a receptores proteicos Delvo-X-Press.....	78
Figura 25. Procedimiento analítico del método de unión a receptores proteicos Rosa Charm.....	79
Figura 26. Procedimiento analítico del método de unión a receptores proteicos Snap.....	80
Figura 27. Procedimiento analítico del método de unión a receptores proteicos Twinsensor.....	81

Figura 28. Diseño experimental del estudio sobre la influencia de factores relacionados con la toma de muestras sobre la respuesta de los métodos microbiológicos de cribado.....	87
Figura 29. Sensibilidad de los métodos microbiológicos para las penicilinas al Límite Máximo de Residuos	101
Figura 30. Sensibilidad de los métodos microbiológicos para las cefalosporinas al Límite Máximo de Residuos	102
Figura 31. Sensibilidad de los métodos específicos para las penicilinas al Límite Máximo de Residuos	106
Figura 32. Sensibilidad de los métodos específicos para las cefalosporinas al Límite Máximo de Residuos	107
Figura 33. Sensibilidad de los métodos específicos para la neomicina y la tilosina al Límite Máximo de Residuos	110
Figura 34. Comparación de la sensibilidad de los métodos microbiológicos en la detección de penicilinas.....	114
Figura 35. Comparación de la sensibilidad de los métodos específicos en la detección de cefalosporinas.....	115
Figura 36. Comparación de la sensibilidad de los métodos microbiológicos en la detección de otros antibióticos no betalactámicos.....	116
Figura 37. Dendograma del análisis cluster basado en la sensibilidad de los antibióticos según los diferentes métodos ensayado.....	119
Figura 38. Dendograma del análisis cluster basado en la sensibilidad de los métodos de cribado.....	121
Figura 39. Análisis de componentes principales de los métodos microbiológicos.....	123
Figura 40. Análisis de componentes principales de los métodos específicos.....	125
Figura 41. Efecto del conservante y del tiempo de refrigeración de las muestras de leche sobre la curva dosis-respuesta de los métodos microbiológicos para la amoxicilina.....	135
Figura 42. Efecto del tiempo de refrigeración sobre las pérdidas relativas de actividad antimicrobiana (PAA) de amoxicilina en la leche.....	140
Figura 43. Efecto del conservante y del tiempo de refrigeración de las muestras de leche sobre la curva dosis-respuesta de los métodos microbiológicos para la ampicilina.....	145
Figura 44. Efecto del tiempo de refrigeración sobre las pérdidas relativas de actividad antimicrobiana (PAA) de ampicilina en la leche.....	149
Figura 45. Efecto del conservante y del tiempo de refrigeración de las muestras de leche sobre la curva dosis-respuesta de los métodos microbiológicos para la penicilina G.....	152
Figura 46. Efecto del tiempo de refrigeración sobre las pérdidas relativas de actividad antimicrobiana (PAA) de penicilina G en la leche.....	156
Figura 47. Efecto del conservante y del tiempo de refrigeración de las muestras de leche sobre la curva dosis-respuesta de los métodos microbiológicos para la oxitetraciclina....	160
Figura 48. Efecto del tiempo de refrigeración sobre las pérdidas relativas de actividad antimicrobiana (PAA) de oxitetraciclina en la leche.....	163

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1. UTILIZACIÓN DE ANTIMICROBIANOS EN PRODUCCIÓN ANIMAL

1.1. Consideraciones previas

El uso de medicamentos veterinarios, y concretamente aquellos de tipo anti-infeccioso, representa una práctica muy frecuente en la cría y explotación del ganado, que resulta necesaria para el mantenimiento de un nivel productivo económicamente rentable (IFAH, 2006).

Actualmente, existen una gran variedad de sustancias que se emplean en el tratamiento de las enfermedades que afectan, tanto a los animales de compañía como a los destinados a la producción de alimentos para consumo humano.

En el caso concreto del ganado lechero, la terapia con agentes antimicrobianos presenta efectos muy positivos que se contrarrestan con el hecho de que pueden aparecer residuos de estas sustancias en la leche, incluso varios días después de finalizar el tratamiento.

La presencia en la leche de sustancias antimicrobianas puede tener graves consecuencias tanto desde el punto de vista toxicológico como tecnológico. Por todo ello, dentro de los programas de control de calidad de la leche existe un apartado dedicado a controlar la presencia de residuos de sustancias antimicrobianas, ya que estos influyen directamente en la calidad de la misma.

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

Para establecer una adecuada estrategia de control de residuos de antibióticos es necesario conocer la causa de su presencia en la leche y cuáles son las sustancias que se emplean con mayor frecuencia, ya que el uso de un tipo u otro, puede variar entre distintas zonas, y además conocer otros factores relacionados con las características de los métodos empleados en su detección.

1.2. Conceptos generales y clasificación de los antimicrobianos

Los antimicrobianos se definen como aquellas sustancias de origen natural, semisintético y sintético que provocan la inhibición o muerte del crecimiento bacteriano. Dentro de los agentes antimicrobianos se distingue el grupo de los antibióticos, considerados como sustancias de bajo peso molecular sintetizadas a partir de otros microorganismos, que producen a bajas concentraciones la inhibición o muerte de otros microorganismos (Giguère y col., 2006).

Las propiedades que se buscan en un agente antimicrobiano para ser utilizado en el tratamiento de enfermedades infecciosas, se pueden resumir según Rang y col. (2000) en:

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

Por otro lado, en cuanto a la clasificación de los antimicrobianos esta se puede establecer basándose en distintos criterios. Actualmente el sistema más utilizado por la comunidad científica es el que agrupa a los compuestos por similitud química, según los núcleos base de sus estructuras, que les confieren cierta semejanza en sus propiedades físico-químicas y farmacológicas.

En el Cuadro 1 se expone una clasificación de los agentes antimicrobianos realizada a partir de diferentes autores (Sumano y Ocampo 1997 y Merck & CO, 2006), agrupándolos según su estructura química junto con las características principales de cada uno de los grupos de sustancias.

Cuadro 1. Clasificación de los diferentes agentes antimicrobianos

Antimicrobianos: Antibióticos	
<i>Betalactámicos: Penicilinas y cefalosporinas</i>	
Sustancias	Amoxicilina, penicilina G, cefalexina, cefoperazona, etc.
Características	Estructura con anillo betalactámico
Efecto bacteriano	Bactericidas
Mecanismo de acción	Inhibición de la síntesis de la pared celular
<i>Aminoglucósidos</i>	
Sustancias	Estreptomina, DH- estreptomina, neomicina, gentamicina, etc.
Características	Azúcares aminados y anillo aminociclitol
Efecto bacteriano	Bactericidas
Mecanismo de acción	Inhibición de la síntesis proteica
<i>Tetraciclinas</i>	
Sustancias	Tetraciclina, oxitetraciclina, clortetraciclina, doxiciclina, etc.
Características	Estructura con anillo naftaleno (4 anillos)
Efecto bacteriano	Bacteriostáticos
Mecanismo de acción	Inhibición de la síntesis proteica
<i>Macrólidos</i>	
Sustancias	Eritromicina, oleandomicina, tilosina, espiramicina, etc.
Características	Estructura con anillo latónico con azúcares aminados
Efecto bacteriano	Bacteriostáticos
Mecanismo de acción	Inhibición de la síntesis proteica
Antimicrobianos: Sintéticos	
<i>Quinolonas</i>	
Sustancias	Ácido nalidíxico, ciprofloxacina, norfloxacina, enrofloxacina,, etc.
Características	Derivados del ácido carboxílico
Efecto bacteriano	Bactericidas
Mecanismo de acción	Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos
<i>Sulfonamidas</i>	
Sustancias	Sulfatiazol, sulfametazina, sulfadiazina, sulfasomidina, etc.
Características	Núcleo básico p-amino-bencenosulfonamida
Efecto bacteriano	Bacteriostáticos
Mecanismo de acción	Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos
<i>Otros antimicrobianos: Cloranfenicol y derivados, Lincosamidas, Polimixinas, Rifamicinas, Nitrofuranos, Nitromidazoles, etc.</i>	

1.3. Tratamientos empleados en ganado vacuno lechero

1.3.1. Principales procesos patológicos del ganado vacuno lechero

Actualmente las enfermedades infecciosas más importantes del ganado vacuno lechero son las mastitis, metritis, neumonías, enteritis y cojeras (Zwald y col., 2004; Sawant y col., 2005), y para el tratamiento y/o profilaxis de estas patologías es frecuente el uso de medicamentos veterinarios antimicrobianos.

Al respecto un estudio llevado a cabo en Suiza (Diserens y col. 2005) durante el período comprendido entre los años 2003 y 2004, indica que el 74,6% de los tratamientos realizados fueron de tipo intramamario, y de éstos un 44,2 % se aplicaron para la fase de secado mientras que el 30,4 % durante la mastitis. El resto de tratamientos se destinaron a las enfermedades infecciosas derivadas del momento del parto (10,0%) y del tracto digestivo (5,5%). Por el contrario los tratamientos relacionados con enfermedades de los pezones (1,5%) y pulmones (1,3%) fueron menos frecuentes.

En el caso concreto de España, Zorraquino y col. (2007) realizaron un estudio para el actual Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino (MARM), anteriormente Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPYA), que tuvo como objetivo el cálculo de la frecuencia de uso de antimicrobianos en el tratamiento de la mastitis del ganado vacuno lechero. Al año siguiente Zorraquino (2008) llevo a cabo un segundo estudio con el mismo objetivo pero en este caso para los tratamientos de otras patologías infecciosas “no mamíticas” (metritis, procesos infecciosos podales, neumonías, heridas postquirúrgicas y otros procesos infecciosos).

A partir de los resultados obtenidos en los estudios citados anteriormente se estimaron los porcentajes de aparición de las patologías más frecuentes en ganado vacuno lechero que se exponen en la Figura 1. En ella se evidencia que la mayoría de los tratamientos (85%) corresponden al tratamiento o la prevención de la mastitis y el resto a otras patologías como la metritis (3,44%), infecciones podales (3,03%) y neumonías (2,99%) entre otros.

Como es sabido, en el caso del vacuno lechero la mastitis es una de las patologías más frecuentes y la que mayores pérdidas económicas y gasto veterinario conlleva (Sawant y col., 2005). Por ello para controlar la infección, se han desarrollado diversas estrategias terapéuticas, se han utilizado numerosos medicamentos (antimicrobianos, antiinflamatorios, vacunas, vitaminas, citoquinas, homeopatía, etc.), y además se han ensayado distintas rutas de administración (sistémica, intramamaria

o aplicación local) aunque el tratamiento de las mastitis se realiza fundamentalmente mediante la utilización de medicamentos antimicrobianos (Gruet y col., 2001).

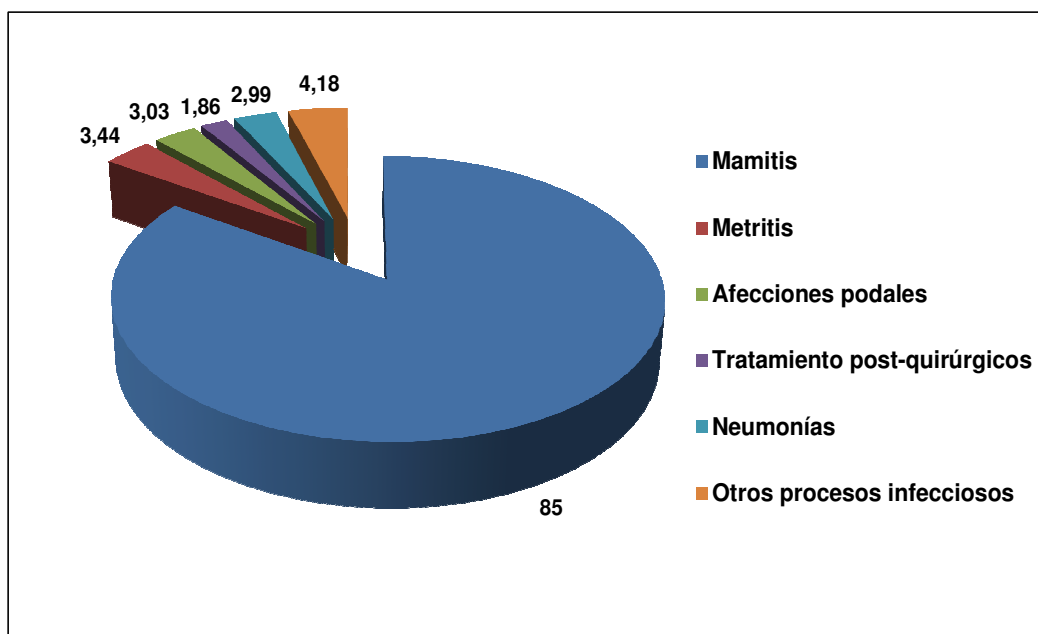


Figura 1. Frecuencia de tratamientos con sustancias antimicrobianas de diferentes patologías del ganado vacuno lechero

Fuente: Elaborado a partir de Zorraquino y col. (2007); Zorraquino (2008)

En general, los antimicrobianos se pueden utilizar en las mastitis en dos fases del ciclo productivo: para tratar vacas en lactación en el momento en que aparece el brote (mastitis clínica) o para reducir las infecciones subclínicas durante el periodo seco y así aumentar la vida productiva del animal (Erskine y col., 2003).

La mastitis clínica, se manifiesta por la alteración de la secreción láctea (leche con grumos, coágulos o secreciones acuosas) que además produce la inflamación, rubor y/o dolor a la palpación de la glándula mamaria. Este tipo de mastitis puede tener consecuencias muy severas para el animal, ya que puede llegar a provocar su muerte o su sacrificio prematuro al dejar de ser productivo. La terapia más frecuente de la mastitis clínica se realiza con sustancias antimicrobianas, principalmente con penicilina, estreptomicina y neomicina (Zorraquino y col., 2007).

La mastitis subclínica es la que ocasiona mayores pérdidas debido a que al no presentar síntomas visibles puede llegar a pasar inadvertida para el ganadero. Este tipo de mastitis se manifiesta fundamentalmente por un aumento del nivel de células somáticas, y como consecuencia produce menos leche y de peor calidad. Para el tratamiento de la mastitis subclínica es frecuente el uso de cloxacilina, cefoperazona o

cefapirina (Erskine y col., 2003), solos o combinados con novobiocina o neomicina (Zorraquino y col., 2007).

La metritis constituye la segunda patología en cuanto a frecuencia de aparición, y se manifiesta con una inflamación de las paredes musculares del útero y del endometrio. El animal presenta fiebre postparto, anorexia y/o depresión entre otros efectos. El tratamiento más habitual se basa en la combinación de penicilina y estreptomina, aunque también se utiliza con menor frecuencia la oxitetraciclina, cefapirina y ceftiofur (Zorraquino, 2008).

Debido a la evolución de las explotaciones ganaderas hacia sistemas más intensivos, así como a las condiciones de producción y manejo, las afecciones podales se han transformado en un problema de gran repercusión desde el punto de vista económico para el productor. Uno de los primeros síntomas es la disminución de la producción láctea, incluso antes de la aparición de la propia cojera. En el tratamiento de las cojeras de origen infeccioso se utiliza con una mayor frecuencia sustancias como el ceftiofur, la tilosina y la oxitetraciclina (Zorraquino, 2008).

En el caso de otros procesos infecciosos menos frecuentes, como es el caso de las infecciones intestinales, las oculares o heridas en general, las moléculas más utilizadas en este tipo de tratamientos, según Zorraquino (2008), son las sulfamidas combinadas con trimetopim y también las quinolonas.

1.3.2. Frecuencia de uso de antimicrobianos empleados en ganado vacuno lechero

Los estudios de frecuencia del empleo terapéutico de los distintos grupos de antimicrobianos (penicilinas, cefalosporinas, aminoglucósidos, macrólidos, quinolonas sulfamidas, tetraciclinas, etc.) en animales, son muy reducidos. A este respecto, Bywater (2004) asegura que la recopilación de datos es un trabajo difícil de realizar, debido en parte a la existencia de un mercado de fármacos genéricos desconocido entre las fronteras. Además, se debe agregar el hecho de que no todas las compañías farmacéuticas están asociadas a grandes organizaciones industriales, situación que dificulta aún más la recolección de la información.

Actualmente, se pueden considerar como datos disponibles y fiables aquellos que ofrecen los distintos gobiernos a través del contacto directo con las compañías farmacéuticas, como el caso del Reino Unido, y los datos que proceden de la obligación oficial de informar acerca de todas las ventas llevadas a cabo en algunos países como Dinamarca, Finlandia y Suecia (Sarmah y col., 2006).

En ese sentido, Diserens y col. (2005) recopilaron información sobre el uso de antibióticos en vacas lecheras en lactación para los tratamientos de mastitis y secado en 23 países (Argentina, Austria, Países Bálticos, Bélgica, Canadá, Colombia, Croacia, Dinamarca, Finlandia, Francia, Alemania, Grecia, Irán, Irlanda, Japón, México, Portugal, España, Suiza, Suecia, Tailandia, Reino Unido y Estados Unidos). En la Figura 2 se representa la frecuencia de los antibióticos más empleados en las formulaciones farmacéuticas. Se observa que del total de productos farmacéuticos estudiados, las moléculas más utilizadas son: cloxacilina (32,7%), penicilina (23,4%), ampicilina (15,6%) y neomicina (14,9%), seguidas en menor importancia por DH-estreptomicina (9,5%), cefalexina (5,1%), lincomicina (4,3%) y en menores proporciones otras como la amoxicilina, cefapirina y cefoperazona.

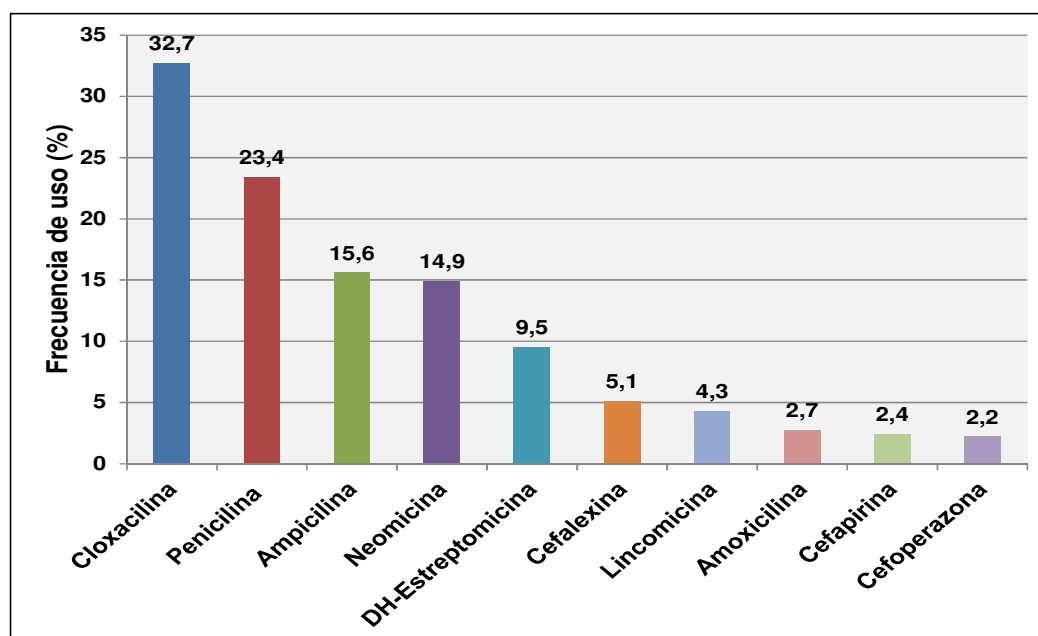


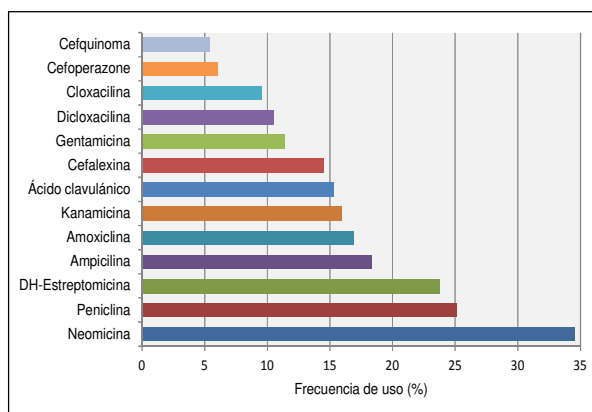
Figura 2. Frecuencia de uso de antibióticos empleados en formulaciones farmacéuticas de productos veterinarios para el tratamiento de la mastitis

Fuente: Diserens y col. (2005)

En España, para el caso concreto de la mastitis, Zorraquino y col. (2007) calcularon las frecuencias de utilización de antibióticos en los tratamientos antimaméticos, durante el año 2006, basándose en los preparados vendidos durante ese año por los laboratorios asociados a Veterindustria y en una de serie de encuestas efectuadas a un 25% de las explotaciones de vacuno lechero (6.618 explotaciones), que representaban el 11% del censo vacuno de leche (334.243 vacas) en España. Los resultados obtenidos en dicho estudio se resumen en la Figura 3, donde se presenta un cuadro con los grupos de sustancias más utilizados y una figura con las moléculas.

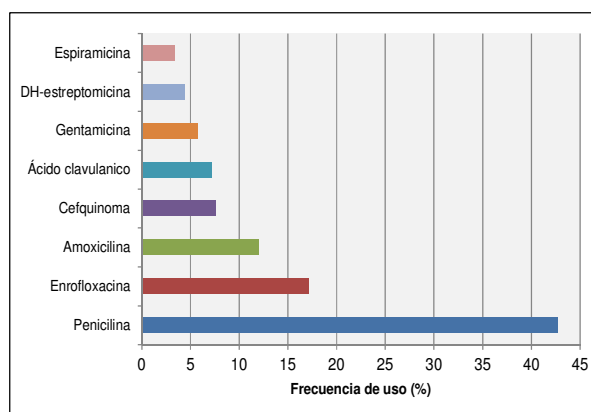
A. Vía intramamaria en lactación

Antimicrobianos	Frecuencia uso (%)
Penicilinas	39
Aminoglucósidos	34
Cefalosporinas	11
Colistina	6
Macrólidos	4
Novobiocina	3
Tetraciclinas	2
Sulfonamidas	1



B. Vía parenteral en lactación

Antimicrobianos	Frecuencia uso (%)
Penicilinas	54
Quinolonas	18
Aminoglucósidos	9
Cefalosporinas	7
Macrólidos	5
Sulfonamidas	2
Colistina	2
Trimetropin	2



C. Vía intramamaria en fase seca

Antimicrobianos	Frecuencia uso (%)
Penicilinas	58
Aminoglucósidos	23
Cefalosporinas	18

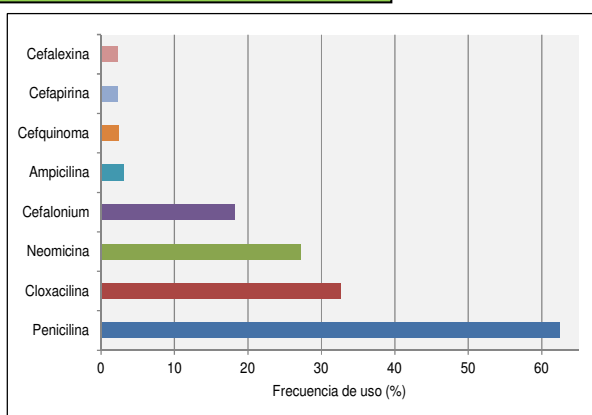


Figura 3. Frecuencia de uso de sustancias antimicrobianas en el tratamiento de la mamitis del ganado vacuno lechero

Fuente: Zorraquino y col. (2007)

El mencionado trabajo muestra que en los tratamientos intramamarios de vacas en lactación (Figura 3A), los antibióticos betalactámicos (39% penicilinas y 11% cefalosporinas) son el grupo más empleado contra la mastitis, seguidos por los aminoglucósidos (34%) y en menor proporción las tetraciclinas, sulfamidas, macrólidos, etc. Con respecto a las moléculas más empleadas en los tratamientos intramamarios corresponden a neomicina (34,5%), penicilina (25,1%), estreptomicina (23,8%), ampicilina (18,3%), amoxicilina (16,9%), kanamicina (15,9%), ácido clavulánico (15,3%), cefalexina (14,5%), gentamicina (11,4%), dicloxacilina (10,5%), cloxacilina (9,5%), cefoperazona (6,0%) y cefquinoma (5,4%).

Para los tratamientos por vía parenteral (inyectables) de la mastitis de vacas durante el período de lactación (Figura 3B), los datos del análisis de las encuestas realizadas por Zorraquino y col. (2007) destacan que los betalactámicos (54% penicilinas y 7% cefalosporinas) son también el grupo de sustancias más utilizadas como inyectable, seguidas de las quinolonas (18%), los aminoglucósidos (9%) y los macrólidos (5%). Las moléculas de mayor uso resultaron ser la penicilina (43,1%), enrofloxacin (17,3%), amoxicilina (12,1%), cefquinoma (7,7%) y ácido clavulánico (7,3%), seguido en menor importancia por gentamicina (5,8%), estreptomicina (4,4%) y espiramicina (3,4%).

En cuanto a la fase del secado, tal y como se expone en la Figura 3C, dichos autores señalan que los antibióticos más empleados en forma intramamaria corresponden a dos familias de antibióticos, betalactámicos que representa el 76% (penicilinas: 58% y cefalosporinas: 18%) y aminoglucósidos con un 23%. En cuanto a las moléculas más utilizadas con porcentajes superiores al 10% resultaron ser: la penicilina (62,4%), cloxacilina (32,6%), neomicina (27,1%) y cefalonio (18,2%).

Respecto a otras patologías, Zorraquino (2008) realizó un estudio basado en encuestas a veterinarios responsables de agrupaciones sanitarias y productores de leche donde evalúa los tratamientos empleados en distintas patologías diferentes a la mastitis. Dentro de estas patologías, refiriéndose a las encuestas a veterinarios y su ponderación por rebaños, indica que los tratamientos de la metritis (17,6%) constituyen el mayor riesgo después de la mastitis de contaminación de la leche, seguidos de los destinados a terapéutica de procesos infecciosos podales (15,5%), los procesos respiratorios en especial las neumonías (15,3%), las heridas quirúrgicas post-operatorias (9,5%) entre otros procesos infecciosos.

En el Cuadro 2 se exponen los resultados de las citadas encuestas referentes a la frecuencia de uso de los diferentes grupos de antimicrobianos en procesos infecciosos diferentes a la mastitis (metritis, infecciones podales, heridas quirúrgicas, neumonías, y otras enfermedades infecciosas), mientras que en el Cuadro 3 se presenta la frecuencia de uso por moléculas o sustancias antimicrobianas.

Como se puede observar para el tratamiento de la metritis, los antibióticos betalactámicos son los más utilizados (52%), correspondiendo el 30% a las cefalosporinas y el 22% a las penicilinas, siendo la moléculas más utilizadas la penicilina G y la cefapirina (Cuadro 3). Otros grupos utilizados para el tratamiento de la metritis son los aminoglucósidos (23%) y las tetraciclinas (21%), dentro de los cuales las sustancias más utilizadas son DH-estreptomicina y la oxitetraciclina.

Cuadro 2. Frecuencia de uso de familias de antimicrobianos en tratamientos de otras patologías diferentes a la mastitis del ganado vacuno lechero

Familia de antimicrobianos	Frecuencia de uso (%)				
	Metritis	Infecciones podales	Heridas quirúrgicas	Neumonías	Otros procesos
Aminoglucósidos	23	11	40	10	11
Betalactámicos	52	41	45	31	13
<i>Penicilinas</i>	22	14	40	17	11
<i>Cefalosporinas</i>	30	27	5	14	2
Macrólidos	-	26	-	7	3
Quinolonas	1	2	-	12	22
Sulfonamidas	2	3	-	5	23
Tetraciclinas	21	12	10	26	3
Otros	1	4	-	8	25

Fuente: Zorraquino (2008)

En cuanto a la terapéutica de los procesos infecciosos podales, los grupos de antimicrobianos más seleccionados resultaron ser los betalactámicos (41%), aunque es este caso las sustancias más utilizadas son la cefalexina y el ceftiofur tal y como se observa en el Cuadro 3. En menor medida se utilizan la tilosina (22,6%) que pertenece al grupo de los macrólidos y entre las tetraciclinas, la oxitetraciclina (12%).

En el caso de las heridas quirúrgicas, también los betalactámicos son los que se emplean con mayor frecuencia (45%), seguidos de cerca por los aminoglucósidos (40%), y por último las tetraciclinas (10%). En cuanto a moléculas presentan casi la misma frecuencia la penicilina G y la DH-estreptomicina, aproximadamente el 40% ambas moléculas.

Para las neumonías los antibióticos más elegidos son los betalactámicos (31%) y las tetraciclinas (26%), en el Cuadro 3 se observa que las moléculas que presentan una mayor frecuencia de uso son la oxitetraciclina (26,7%) y el ceftiofur (14,6%). También se emplean un amplio grupo de otras sustancias como quinolonas (12%), aminoglucósidos (10%), trimetropin (6%), sulfonamidas (5%) y la colistina (2%).

Cuadro 3. Frecuencia de uso de sustancias antimicrobianas en tratamientos de otras patologías diferentes a la mamitis del ganado vacuno lechero

Sustancias antimicrobianas	Frecuencia de uso (%)				
	Metritis	Infecciones podales	Heridas quirúrgicas	Neumonías	Otros procesos
Cefalexina	<10	31,6	<10	<10	<10
Cefapirina	16,3	<10	<10	<10	<10
Ceftiofur	9,2	24,0	<10	14,6	<10
Penicilina G	20,3	10,0	39,1	<10	<10
DH-estreptomicina	20,4	10,0	38,8	<10	<10
Enrofloxacina	<10	<10	<10	<10	19,1
Oxitetraciclina	17,5	10,8	10,0	26,7	<10
Tilosina	<10	22,6	<10	<10	<10
Trimetropin	<10	<10	<10	<10	19,9

Fuente: Zorraquino (2008)

En todas las enfermedades comentadas anteriormente las sulfonamidas y las quinolonas aparecen con escasa frecuencia, en cambio para otros procesos infecciosos como diarreas, queratitis y otras heridas en general, Zorraquino (2008) señala que las sustancias que más se prescriben pertenecen al grupo de las sulfonamidas (23%) y las quinolonas (22%) utilizando con mayor frecuencia la enrofloxacin (19,1%) y el trimetropin (19,9%).

Teniendo en cuenta las frecuencias de uso de antibióticos para el tratamiento de la mastitis y otras enfermedades infecciosas calculadas en los estudios realizados por Zorraquino y col. (2007) y Zorraquino (2008), y considerando que la mastitis representa el 85% de las enfermedades del ganado vacuno lechero y el 15% restante se debe a otros procesos infecciosos (metritis, infecciones podales, neumonías y heridas post-quirúrgicas) se han calculado las frecuencias de uso de las moléculas más empleadas en el tratamiento de estas patologías que se resumen, en orden creciente de utilización, en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Frecuencia total de uso de antibióticos en el tratamiento de las principales patologías del ganado vacuno lechero

Antibiótico	Frecuencia de uso (%)	Antibiótico	Frecuencia de uso (%)
Penicilina G	34,93	Enrofloxacin	2,28
Neomicina	10,72	Oxitetraciclina	2,24
Estreptomycin	6,91	Cefquinoma	2,10
Gentamicina	5,44	Dicloxacilina	1,62
Cefalexina	4,38	Cefoperazona	1,62
Amoxicilina	4,34	Ceftiofur	1,53
Kanamycin	4,23	Cefalonio	1,30
Cloxacilina	4,21	Lincomycin	1,30
Ampicilina	3,40	Eritromycin	1,06
Colistina	3,03	Tilosina	1,05

Fuente: Elaboración propia a partir de Zorraquino y col. (2007) y Zorraquino (2008)

A modo de síntesis, se puede concluir haciendo uso del Cuadro 4 que los antibióticos que se emplean con mayor frecuencia en los medicamentos para diferentes tipos de tratamientos del ganado vacuno en España son: penicilinas (penicilina, amoxicilina, cloxacilina, ampicilina y dicloxacilina), cefalosporinas (cefalexina, cefquinoma, cefoperazona, ceftiofur y cefalonio), aminoglucósidos (neomicina, gentamicina, kanamicina y estreptomina aunque este último se emplea combinado con la penicilina), quinolonas (enrofloxacina), tetraciclinas (oxitetraciclina) y en menor medida lincomicina, eritromicina y tilosina.

2. PRESENCIA DE RESIDUOS DE ANTIMICROBIANOS EN LA LECHE

2.1. Origen de la presencia de residuos de antimicrobianos en la leche

Las sustancias antimicrobianas se pueden administrar de diferentes formas, fundamentalmente por vía parenteral (subcutánea, intramuscular, endovenosa, etc.), intramamaria y oral o en piensos medicamentosos. Una vez administrados los medicamentos son absorbidos, distribuyéndose por el organismo y concentrándose en diferentes proporciones dependiendo de varios factores.

En el organismo los fármacos sufren procesos de biotransformación debido a la acción de enzimas. Esta transformación puede consistir en una degradación (oxidación, reducción o hidrólisis) donde el fármaco pierde parte de su estructura, o por el contrario en la síntesis de nuevas sustancias con el fármaco como parte de la nueva molécula (conjugación). El resultado final de dicho proceso puede ser la inactivación completa o parcial de los efectos del fármaco, el aumento o activación de los efectos, o el cambio por nuevos efectos dependientes de las características de la sustancia sintetizada.

Existen una serie de factores inherentes a la aplicación de las sustancias antimicrobianas (Debackere, 1995), que pueden influir en la cantidad y duración de los tiempos de eliminación y por lo tanto en su presencia en la leche. Entre ellos la naturaleza del antibiótico, la dosis administrada, la influencia del excipiente, la vía de administración y el estado sanitario de la ubre.

Además de todos los factores mencionados anteriormente, uno de los aspectos más importante que condiciona la cantidad de residuos en la leche es el tiempo transcurrido entre el cese de la administración de las sustancias antibacterianas al animal y la obtención del producto final. La cantidad de residuos será mayor en aquellos casos en los que dicho periodo no sea lo suficientemente largo como para permitir la completa eliminación de estos del organismo del animal (Botsoglou y Fletouris, 2001).

Se define como “tiempo de espera” o de seguridad de un antimicrobiano al tiempo necesario que debe transcurrir tras la última aplicación del medicamento y el aprovechamiento de los alimentos obtenidos del animal tratado. Este tiempo de espera, constituye una característica esencial y específica del medicamento para cada tipo de producto (carne, leche, huevos, etc.) y su respeto es necesario para evitar la presencia de residuos en los alimentos por encima de los Límites Máximos de Residuos establecidos por la legislación para cada sustancia y matriz alimentaria.

Los trabajos de investigación llevados a cabo para analizar la causa de la presencia de residuos de antimicrobianos en la leche son muy limitados. De estos estudios destaca el realizado en Francia por Fabre y col. (1995) donde se analizaron 1.018 explotaciones de vacas lecheras, con el propósito de identificar las posibles causas de la presencia de restos de antibióticos en la leche. Del total de explotaciones analizadas, 625 resultaron “granjas positivas” en alguno de los controles oficiales realizados durante un año, y en 516 fue posible identificar las causas que provocaron la presencia de residuos de inhibidores. Estas causas se resumen en la Figura 4, de donde se concluye, que el 88% de los residuos de antibióticos detectados procedían de los tratamientos relacionados con la mastitis (64%) y los tratamientos de secado (24%), mientras que un 11% se deben a otras patologías. Por el contrario, otras posibles causas no relacionadas con la glándula mamaria representan solamente el 2% del total de los casos.

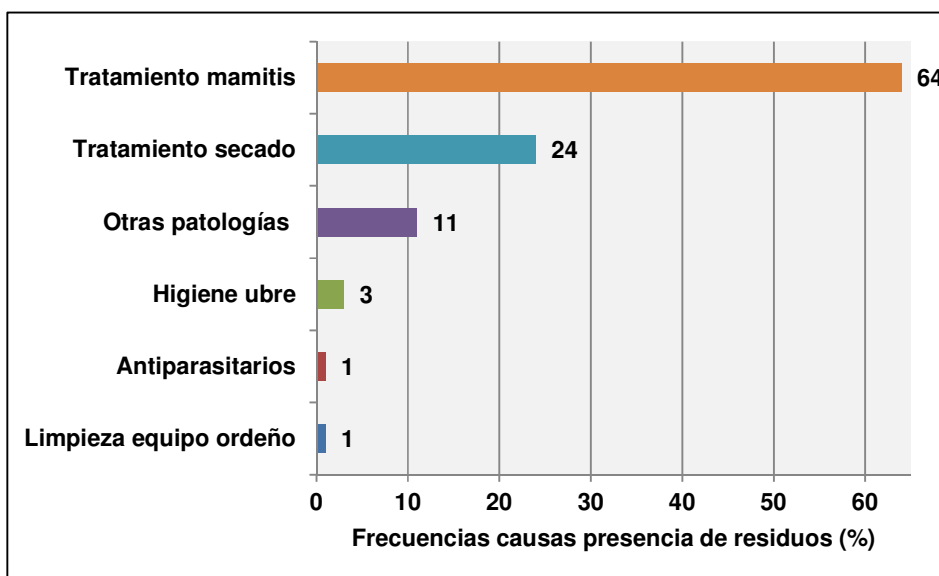


Figura 4. Causas de la presencia de inhibidores en la leche

Fuente: Fabre y col. (1995)

En España el servicio técnico de la cooperativa lechera COVAP (Córdoba), realizó una encuesta sobre las posibles causas de 175 resultados positivos encontrados a partir del análisis de 95.000 muestras de leche (Sánchez y col., 2001). En todos los casos se determinó la implicación del tratamiento de la mastitis, y las causas de la presencia de residuos se clasificaron en los diferentes conceptos que se presentan en la Figura 5.

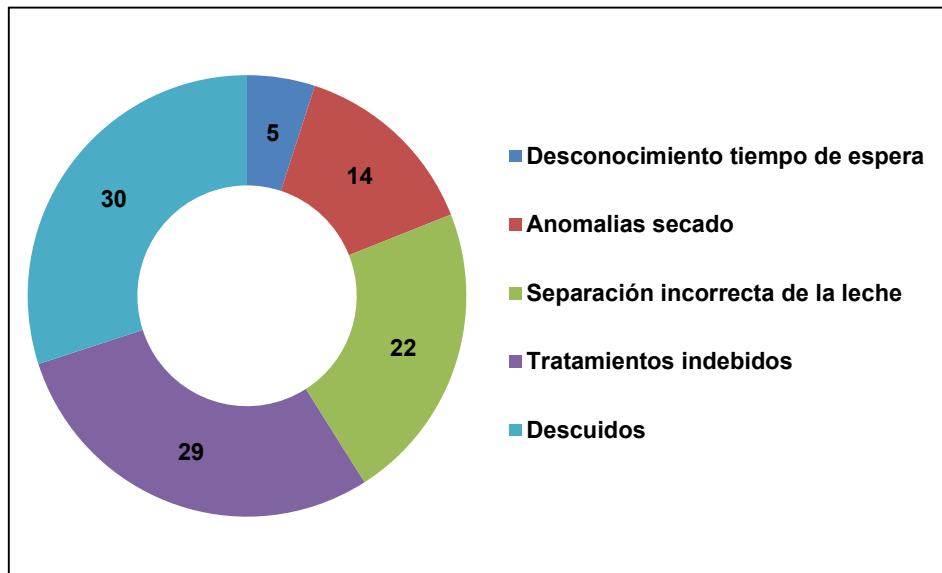


Figura 5. Causas de la presencia de residuos de antibióticos en la leche relacionados con los tratamientos de la mastitis

Fuente: Sánchez y col. (2001)

2.2. Frecuencia de la presencia de residuos de antimicrobianos en la leche

El Cuadro 5 resume los principales trabajos que analizan la frecuencia de la presencia de residuos de antimicrobianos en la leche. En Europa la frecuencia de antibióticos en la leche alcanzaba durante los años sesenta entre el 5 y el 11% en el Reino Unido (Booth y col., 1986) y esta frecuencia disminuyó con los años hasta alcanzar valores en el año dos mil cinco de un 0,04% en Alemania (Kress y col., 2007). Estos resultados son similares a los señalados en Estados Unidos con una frecuencia, en 1960, entre el 5,2 y el 6% que disminuyó hasta el 0,04% en el año 2004.

Según indica Zorraquino y col. (2007), la incidencia de residuos de antibióticos en la leche ha disminuido en los últimos años, debido fundamentalmente a la implementación de las buenas prácticas ganaderas y los controles cada vez más frecuentes mediante el uso de métodos de cribado.

Cuadro 5. Presencia de residuos de antibióticos en la leche en diferentes países

Año	País	Frecuencia (%)	Referencia
<i>Europa</i>			
1960	Reino Unido	5	Seymour y col. (1988)
1961	Reino Unido	11,1	Booth y col. (1986)
1984/85	Reino Unido	0,4	Booth y col (1986)
1993	Alemania	2,8	Suhren y col. (1994)
1996	Portugal	44	Fontes y col.(1996)
1998/02	Alemania	0,23-0,31	Suhren y Walte (2003)
2000	España	0,18	Sánchez y col. (2001)
2001	Italia	0,34	Ghidini y col. (2003)
2003	Bélgica	0,11	FAVV (2003)
2005	Alemania	0,04	Kress y col. (2007)
<i>EE.UU</i>			
1960	-	5,2-6	Albright y col.(1961)
1975	-	7-15	Jones y Seymour (1988)
1988	Virginia	0,06-0,2	Jones y Seymour (1988)
1999/00	New Cork	0,04	Van Schaik y col. (2002)
1994	-	0,05-0,06	Sischo (1996)
1995	-	0,1	Anderson y col. (1998)
1997	-	0,1	Saville y col. (2000)
1995/98	Wiscosin	0,03	Rueg y Tabone (2000)
2003	-	0,05	FDA (2003)
2004	-	0,04	Dalton (2006)
<i>Otros</i>			
1999	Caribe	8-15	Baynes y col. (1999)
2004	Kenia	8-15	Shitandi y Kihumbu (2004)
2009	Brasil	4	Fonseca y col. (2009)
2010	México	18,6	Camacho y col. (2010)

Por el contrario, en lugares donde la presión de los controles es menor las frecuencias de aparición son más elevadas (Cuadro 5), como sucede, por ejemplo en Kenia (8-15%) o México (18,6%).

Numerosos trabajos del Cuadro 5 señalan que un alto porcentaje de estos residuos corresponden a antibióticos betalactámicos (Anderson y col., 1998; Ghidini y col., 2003; Dalton, 2006; Kress y col., 2007), debido principalmente a que las penicilinas son los antibióticos más empleados a lo largo del tiempo y al hecho de que los métodos de cribado empleados para su control son más sensibles para la detección de estos antibióticos y menos para otros grupos, como por ejemplo las quinolonas o los macrólidos (Linage y col., 2007; Montero y col., 2005; Althaus y col., 2009).

2.3. Efectos de la presencia de residuos de antimicrobianos en la leche

La presencia de residuos de antimicrobianos en la leche puede producir efectos negativos sobre la salud humana (Moretain, 1996; Anthony y col., 2001; Demoly y Romano, 2005; Miranda y col., 2009). Entre los principales problemas que se pueden ocasionar destacan: la sensibilización a los antibióticos producida por una ingestión repetida de pequeñas dosis, procesos alérgicos que pueden, en casos extremos, llevar a la anafilaxia, perturbaciones pasajeras en la flora intestinal del consumidor, reacciones de intoxicación frente a determinados antibióticos de gran toxicidad y desarrollo de resistencias a agentes antibacterianos como resultado de la exposición repetida de las bacterias a dichas sustancias.

El desarrollo de resistencias de los microorganismos a los antimicrobianos constituye un tema de gran actualidad (Tollefson y Karp, 2004; Phillips y col., 2004; Miranda y col., 2009), ya que el mal uso de antimicrobianos empleados tanto en medicina humana como en veterinaria contribuyen a su aparición.

Durante la última década, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización Mundial de la Sanidad Animal (OIE) junto a la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Comisión del Codex Alimentarius, han abordado el riesgo potencial (derivado del uso de antimicrobianos en el tratamiento y la prevención de enfermedades en animales destinados a la producción de alimentos) de que aparezcan y se extiendan organismos resistentes a los agentes antimicrobianos.

Concretamente, el hecho de que se empleen en gran medida las mismas clases de antimicrobianos en humanos y animales (Phillips y col., 2004) y de que se hayan elaborado muy pocos antibióticos nuevos para sustituir a los que se han vuelto relativamente ineficaces a causa de las resistencias, ha dado lugar a un acuerdo sobre la necesidad de crear ciertas medidas, referentes al uso responsable y prudente de los

antimicrobianos o la vigilancia de la aparición de resistencias a estos agentes en medicina humana y veterinaria.

Por este motivo, con el objetivo de promover el uso responsable de medicamentos en animales en la UE, según define la Directiva 82/2001/CE modificada por la Directiva 28/2004/CE, se creó en 2005 la Plataforma Europea para el Uso Responsable de Medicamentos en Animales (EPRUMA) y se elaboró el “Marco de buenas prácticas para el uso de antimicrobianos en animales productores de alimentos en la UE” (Veterindustria, 2010) documento con el que se pretende proporcionar un marco descriptivo de buenas prácticas con el objetivo de que veterinarios y ganaderos trabajen conjuntamente para garantizar el uso seguro de antimicrobianos y reducir al mínimo el desarrollo de resistencias.

Estas actividades han abordado con especial énfasis el uso racional de antimicrobianos en producción animal, incluyendo en ellos programas de farmacovigilancia de resistencias bacterianas con el fin de disminuir el riesgo de transmisión a la población humana, asegurar la eficacia terapéutica de estos agentes en las especies de destino y asegurar que los productos originados de animales tratados con antimicrobianos lleguen sin residuos al consumidor.

Por otro lado, la presencia de residuos de antimicrobianos en la leche también puede tener efectos de tipo tecnológico, ya que afecta a los procesos bacterianos en la elaboración de productos fermentados como el queso y el yogur. La presencia de estos residuos produce alteraciones en la flora láctica dando lugar a procesos de mala calidad (Packham y col., 2001), como el retraso en la acidificación o la dificultad en el cuajado y la maduración (Mourot y Loussouarn, 1981; Brady y Katz, 1987, Suhren, 2002, Berruga y col., 2007a, Berruga y col., 2007b), llegando incluso a inhibir completamente la fermentación en algunos casos (Grunwald y Petz, 2003).

Los daños tecnológicos que produce la presencia de estos residuos dependen de la naturaleza de los antibióticos, su concentración en la leche y el tipo de producto a fabricar (Mäyra-Mäkinen, 1995).

Por otra parte, la presencia de residuos de antibióticos puede influir en el resultado del recuento de gérmenes, produciendo interferencias en la prueba de la reductasa y dando resultados erróneos en el recuento de patógenos, falseando de esta forma la calidad higiénica de la leche (Moretain, 1996).

También, es importante señalar que algunas de las sustancias farmacológicas presentes en la leche resisten las altas temperaturas, por lo que pueden llegar al consumidor aún después de haber sido sometidas a tratamientos térmicos en la

industria (Oda y Hiwaki 1996; Zorraquino 2005; Zorraquino y col., 2008a, b; Roca y col., 2010), lo que agrava todavía más el problema que supone la presencia de estos residuos para la salud del consumidor.

Tampoco hay que olvidar la importancia que tiene la presencia de residuos en la leche para el propio ganadero o productor de leche, ya que puede llevar a la prohibición por parte de las autoridades sanitarias de la comercialización de la leche cruda, al ser calificada esta como “no apta para consumo humano” por contener residuos de determinadas sustancias entre las que se encuentran los medicamentos, según el Reglamento 853/2004/CEE, donde se establecen las normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal.

La posible restricción de la comercialización de la leche, así como los gastos de almacenamiento y/o los costes derivados de su destrucción por incumplimiento de los requisitos del Plan de control, son responsabilidad del ganadero y representan, por lo tanto, pérdidas económicas importantes.

3. CONTROL DE LA PRESENCIA DE ANTIMICROBIANOS EN LA LECHE

3.1. Consideraciones previas

El control de la presencia de residuos de antimicrobianos en la leche está regulado a nivel comunitario por la Directiva 96/23/CE, que establece la obligatoriedad de detectar la presencia de residuos de medicamentos veterinarios y otras sustancias como pesticidas, micotoxinas, etc. en todos los productos de origen animal destinados al consumo humano, dentro de un Plan Nacional de Vigilancia de Residuos.

Además, el Reglamento 853/2004/CE especifica claramente que la leche cruda destinada al consumo humano no ha de presentar residuos de antimicrobianos que superen los Límites Máximos de Residuos establecidos en la legislación, para poder ser comercializada en el ámbito de la Unión Europea.

En España, para cumplir con los requisitos establecidos en el Reglamento 853/2004/CE se publicó el Real Decreto 1728/2007 en el cual se especifica la normativa básica de control del sector lácteo, indicando por un lado los controles mínimos obligatorios sobre la calidad de la leche cruda de vaca a realizar por los operadores del sector lácteo y los transportistas, así como las bases para la realización de los controles oficiales. En ambos casos, se establece la necesidad de realizar la prueba de detección de residuos de antibióticos.

Además, con este Real Decreto se completa el Real Decreto 217/2004/CE, por el que se regulaban la identificación y registro de los agentes, establecimientos y contenedores que intervienen en el sector lácteo, y el registro de los movimientos de la leche cruda de vaca.

3.2. Límites Máximos de Residuos

Para controlar la presencia de residuos de medicamentos en los alimentos, la UE ha establecido los Límites Máximos de Residuos (LMRs), competencia del Grupo de trabajo de Seguridad de Residuos del Comité de Medicamentos Veterinarios (CVMP, del inglés Committee for Veterinary Medicinal Products).

Para la fijación de los LMRs de las sustancias farmacológicamente activas en los alimentos de origen animal, se ha publicado el Reglamento 470/2009/CE, que deroga el Reglamento 2377/90/CE.

En el Reglamento 470/2009/CEE se definen los LMRs como la “concentración de un residuo de una sustancia farmacológicamente activa que puede permitirse en los alimentos de origen animal”. Este Reglamento pretende en primer lugar proteger la salud humana y animal, por lo cual establece que una sustancia farmacológicamente activa sólo podrá utilizarse en animales productores de alimentos si ha sido objeto de una evaluación favorable por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) obteniendo de esta forma una clasificación de las sustancias activas y las categorías terapéuticas a las cuales pertenecen, bien indicando su LMR, el LMR provisional, la ausencia de establecer un LMR o la prohibición de uso de una sustancia. En segundo lugar, trata de constituir un procedimiento de extrapolación de LMRs ya fijados para una sustancia en un alimento y especie determinada para otros alimentos derivados u otras especies distintas.

Y por último, para facilitar el control de la presencia en los alimentos de sustancias farmacológicamente activas prohibidas o sin regular en la UE, el Reglamento 470/2009/CEE también ha fijado un procedimiento para establecer valores de referencia para este tipo de sustancias, son los llamados “valores de referencia a efectos de intervención” que se definen como la menor concentración de un residuo que pueda ser detectada y confirmada por un laboratorio de control oficial. Es decir, a concentraciones por debajo de este valor de referencia fijado para una sustancia no autorizada no podrá dar lugar a incumplimientos de la legislación comunitaria. Anteriormente eran conocidos como “Límites mínimos de funcionamiento exigidos: MRLP”.

Posteriormente, en el Reglamento 37/2010/CE se recoge la información contenida en los Anexos del antiguo Reglamento 2377/90/CE, fijando los LMRs de sustancias farmacológicamente activas en alimentos de origen animal. En dicho Reglamento, se crean dos listas sustituyendo a los cuatro anexos del antiguo Reglamento. Una primera lista con los LMRs de las sustancias autorizadas y una segunda correspondiente a las sustancias prohibidas. En el Cuadro 6 se recogen los diferentes LMRs para el caso concreto de la leche de algunos de los antibióticos utilizados en ganado vacuno.

Cuadro 6. Límites Máximos de Residuos de antimicrobianos para la leche de vaca

Antimicrobianos	LMR (µg/Kg)	Antimicrobianos	LMR (µg/Kg)
Betalactámicos		Macrólidos/lincosamidas	
Bencilpenicilina	4	Eritromicina	40
Ampicilina	4	Espiramicina	200
Amoxicilina	4	Tilmicosina	50
Penetamato	4	Tilosina	50
Nafcilina	30	Lincomicina	150
Cloxacilina	30	Pirlimicina	100
Dicloxacilina	30	Aminoglucósidos	
Oxacilina	30	Gentamicina	100
Cefacetilo	125	Kanamicina	150
Cefalexina	100	Neomicina	1500
Cefalonio	20	Espectinomina	200
Cefoperazona	50	DH/Estreptomicina	200
Ceftiofur	100	Quinolonas	
Cefquinoma	20	Ciprofloxacina	50
Cefapirina	60	Danofloxacina	30
Cefazolina	50	Enrofloxacina	100
Tetraciclinas		Flumequina	50
Clortetraciclina	100	Marbofloxacina	75
Oxitetraciclina	100	Otros	
Tetraciclina	100	Ácido clavulánico	200
Sulfonamidas		Bacitracina	100
Sulfadiazina	100	Baqueloprim	30
Sulfadimetoxina	100	Cloranfenicol	0
Sulfadimidina	100	Colistina	50
Sulfadoxina	100	Dapsona	0
Sulfanilamida	100	Novobiocina	50
Sulfametazina	100	Rifaximina	60
Sulfatiazol	100	Tianfenicol	50
Sulfadimetoxipiridazina	100	Trimetoprim	50

Fuente: Reglamento 37/2010/CE

3.3. Planes de control

3.3.1. Sistema de gestión de la calidad y trazabilidad de la leche en España

El Reglamento 178/2002/CEE del Parlamento Europeo y del Consejo, estableció la necesidad para las empresas alimentarias de poner en práctica a partir del 1 de enero de 2005, sistemas que permitan, en todas las etapas de producción, transformación y distribución, asegurar la trazabilidad de los alimentos.

Con este fin el anterior Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, (actualmente MARM), publicó el Real Decreto 217/2004, donde se regulaba la identificación y el registro de los agentes, establecimientos y contenedores que intervienen en el sector lácteo, y el registro de los movimientos de la leche cruda de vaca. Este Real Decreto creó la herramienta que permite establecer la trazabilidad de la leche cruda de vaca en España, mediante el Módulo de trazabilidad de la "base de datos Letra Q" (LEche TRAzabilidad, QualiDad), una aplicación informática integrada en el sistema de información "Letra Q", donde están registrados todos los agentes y contenedores del sector lácteo.

En la base de datos "Letra Q" los responsables de los centros lácteos registran todos los movimientos que se producen entre contenedores, desde que la leche cruda sale de la explotación ganadera hasta que llega a un centro lácteo para su transformación.

En la Figura 6 se representa un esquema del sistema para asegurar la trazabilidad de la leche, expuesto en el Real Decreto 217/2004. Con el establecimiento de estos programas de trazabilidad se ha pretendido mejorar la transparencia en los circuitos de comercialización, avanzando en la mejora y control de la calidad de la leche y facilitando al sector el acceso a la información.

Además, con el fin de garantizar el cumplimiento de los requisitos de calidad indicados en los Reglamentos 852 y 853/2004/CEE donde se establecen respectivamente las normas generales relativas a la higiene de los productos alimenticios y las específicas para aquellos de origen animal, y también para asegurar el cumplimiento de los controles oficiales a llevar a cabo en el control de residuos de productos animales destinados al consumo humano (Reglamentos 854 y 882/2004/CEE), se publicó el Real Decreto 1728/2007.

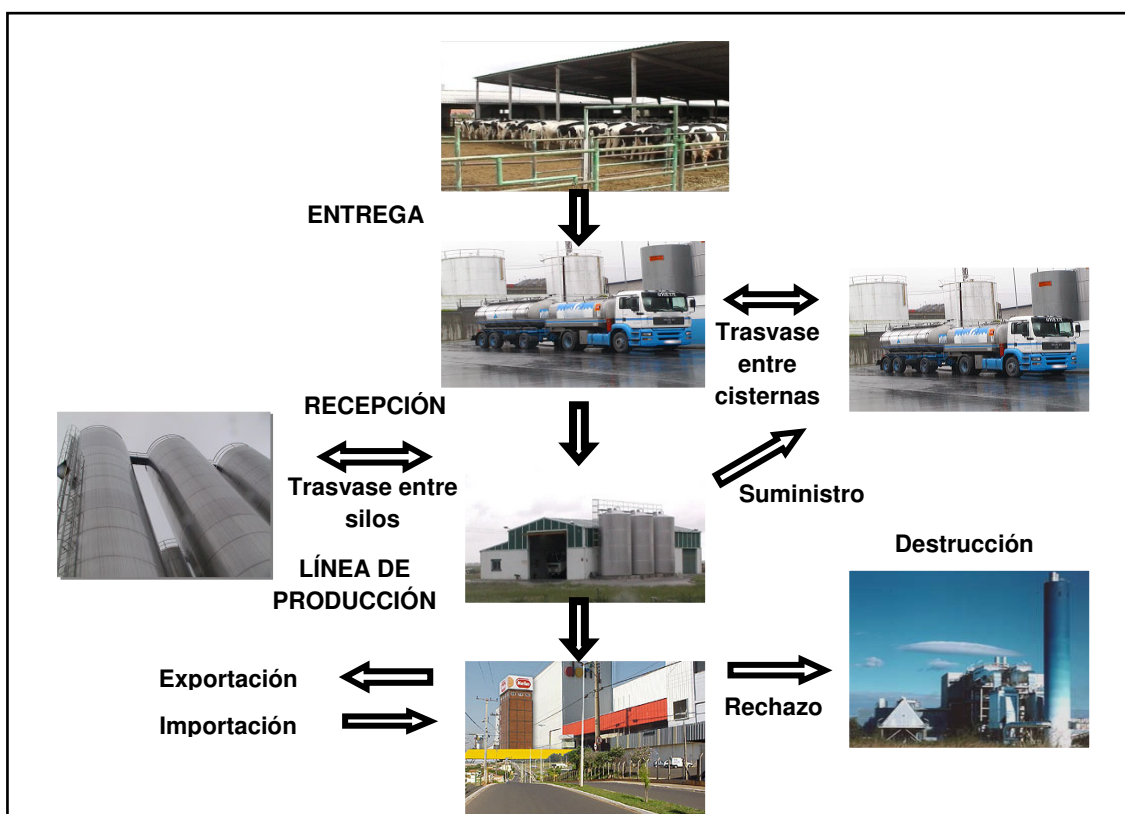


Figura 6. Esquema de las diferentes etapas implicadas en el sistema de gestión de la trazabilidad de la leche cruda de vaca

Fuente: MAPYA (2006)

En este Real Decreto 1728/2007 se establece la normativa básica de control del sector lácteo indicando por un lado las bases para la realización de los controles oficiales en el ámbito de las exigencias de calidad de la producción de la leche, así como los controles mínimos obligatorios sobre la calidad de la leche cruda de vaca a realizar por los operadores del sector lácteo y los transportistas.

Respecto a los controles oficiales el Real Decreto 1728/2007 hace referencia al plan de control que se debe realizar y a las sanciones derivadas de los incumplimientos. De tal forma que las autoridades competentes establecerán los controles necesarios, en los que se abarcaran todos los aspectos relativos a la calidad de la leche cruda de vaca y en el caso de incumplimientos se tomarán medidas para garantizar que el operador solucione la situación. En el caso particular de los residuos de antibióticos la autoridad competente realizará de manera urgente la inmovilización cautelar de la leche hasta que se demuestre su inocuidad.

En cuanto a los controles obligatorios se efectuarán tanto en la explotación como en el centro lácteo. En la explotación, antes de cargar la leche cruda en la cisterna de transporte y en el centro lácteo, previa a su descarga en los silos de almacenamiento. En ambos casos se realizará una verificación de parámetros para

comprobar que reúne las condiciones higiénico-sanitarias adecuadas, como el color, olor, control de la temperatura del tanque y la cisterna de transporte, comprobar la limpieza del tanque y si existe sospecha de deterioro microbiológico se podrán realizar las pruebas de acidez y/o estabilidad al alcohol. También en ambos controles se recogerán muestras obligatorias que se analizarán en los laboratorios para determinar la calidad comercial y la calidad higiénico-sanitaria y se realizarán las pruebas de detección de antibióticos.

También en los controles que se llevan a cabo en las explotaciones y centros lácteos se establece la obligatoriedad de realizar pruebas *in situ* de detección de antibióticos, cuyas condiciones se detallan en el Anexo IV del Real Decreto 1728/2007.

Para las pruebas de detección de antibióticos *in situ* que se realicen en la explotación, en el Anexo IV se detalla que se realizarán análisis que, al menos, detecten antibióticos de los grupos betalactámicos y tetraciclinas antes de cargar la leche en la cisterna.

En los centros lácteos la prueba de detección de antibióticos *in situ* se efectuará previamente a la descarga de la leche en los silos de almacenamiento. En este caso se realizará una prueba para la detección de residuos de antibióticos del grupo de los betalactámicos en todas las cisternas que lleguen al centro lácteo y una prueba de detección de residuos de tetraciclinas, en una de cada 5 cisternas de transporte, de manera que todas las rutas sean analizadas, una vez al mes.

Además en el Anexo IV, tanto para las pruebas realizadas en la explotación como en los centros lácteos, especifica que los métodos utilizados deberán ser capaces de detectar al menos la amoxicilina y ampicilina, entre los betalactámicos y la oxitetraciclina, entre las tetraciclinas. Los métodos utilizados podrán ser específicos de cada grupo y, opcionalmente, se podrán utilizar pruebas capaces de detectar simultáneamente ambos grupos, siempre y cuando se cumpla la frecuencia del grupo de análisis de los betalactámicos, así como los LMR.

En cuanto a la prueba de detección de antibióticos que se debe realizar en los laboratorios de control, el Anexo IV establece que para todas las muestras recibidas se utilicen métodos que, al menos, detecten residuos de betalactámicos y de tetraciclinas y en el caso que se utilice un método sensible a ambos grupos de sustancias y el resultado fuera no conforme, el laboratorio procederá a la identificación del grupo

Todos los laboratorios oficiales comunicarán a la base de datos Letra Q, los resultados de los análisis de las muestras de autocontrol tomadas en las explotaciones antes de la carga de la leche y los resultados correspondientes a las cisternas del centro lácteo, previo a la descarga de estas en los silos de almacenamiento.

Desde la “base de datos Letra Q” se generarán alarmas o avisos a las autoridades competentes de las Comunidades Autónomas para comunicar mensualmente los incumplimientos en células somáticas y bacteriología y diariamente los resultados positivos a la prueba de residuos de antibióticos. En el caso de incumplimientos, en especial en la prueba de antibióticos, se procederá a la inmovilización de la leche y a su posterior destrucción.

3.3.2. Estrategia de control de los residuos de antibióticos en la leche

En el control para la detección de residuos de antibióticos se diferencian dos etapas que se representan en la Figura 7.

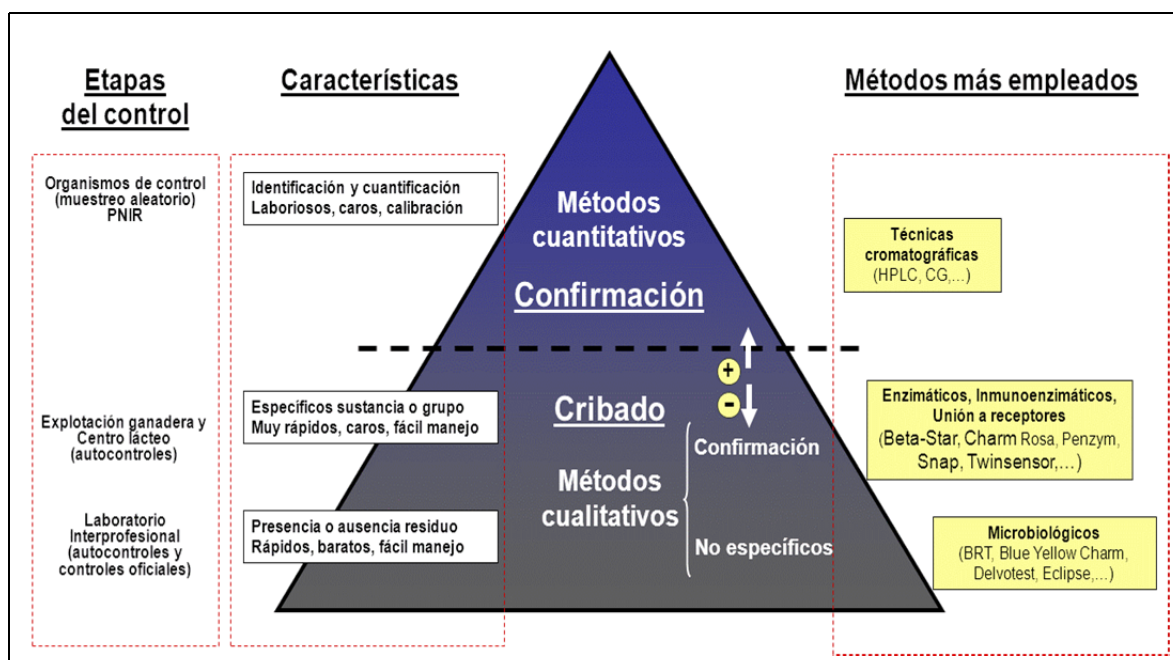


Figura 7. Etapas de control en la detección de antibióticos en la leche

Fuente: Molina y col. (2009)

En la Figura 7 se indica una primera etapa en la que se realiza un control primario de cribado (“screening”) y de confirmación preliminar, en donde se emplean en general métodos cualitativos bien microbiológicos o específicos (enzimáticos, unión a receptores etc.) y cuya finalidad es establecer la presencia o ausencia de residuos por encima de los LMRs. En la segunda etapa de confirmación y cuantificación se

emplean métodos físico-químicos, que se utilizan para identificar de una forma inequívoca la presencia de estos residuos y determinar exactamente la cantidad de anualito presente en las muestras. La técnica más utilizada en esta segunda etapa es la cromatografía líquida (LC).

Para la etapa de cribado, en España el Real Decreto 1728/2007 establece las pautas de control de la presencia de antibióticos en la leche, especificando en el Anexo IV del Real Decreto cómo debe realizarse dicha prueba. También el Artículo 12 del Capítulo III, explica cómo actuar después de realizar la prueba *in situ* exclusivamente para el caso del centro lácteo.

Respecto, a la actuación que se debe realizar después de la prueba de detección de antimicrobianos en las explotaciones ganaderas, el Real Decreto especifica que solo podrá cargarse en las cisternas de transporte la leche que resulte negativa a dicha prueba, sin hacer ninguna referencia al destino de la leche que no resulte conforme.

La forma de eliminación de la leche no conforme en las granjas es su vertido en los estercoleros. Esta práctica, parece ser correcta ya que los residuos de medicamentos veterinarios están considerados subproductos de Categoría 2 (Reglamento CE 1774/2002) y dentro en esta categoría también se incluye el estiércol.

En los centros lácteos, la actuación que hay que llevar a cabo según el resultado de la prueba de detección de antibióticos *in situ* se esquematiza en la Figura 8, a partir de la información recogida en el Real Decreto 1728/2007. De manera que si la prueba de detección de residuos de antibióticos resulta conforme se procede a la descarga de la cisterna o del compartimento con destino al consumo humano. Por el contrario, si la prueba resulta no conforme (positiva) la cisterna deberá ser retirada provisionalmente del consumo pudiéndose descargar en un silo.

En este último caso, se podrá actuar de alguna de las siguientes maneras, a decisión del operador, de acuerdo con lo establecido en su sistema de autocontrol:

a) No realizar ninguna prueba adicional de detección de residuos de antibióticos. En estas condiciones, la leche se considerará un subproducto de origen animal destinado a consumo humano (SANDACH) de Categoría 2 regulado por el Reglamento 1774/2002/CE y se deberá proceder a su destrucción.

b) Realizar inmediatamente, una segunda prueba *in situ*, utilizando un método con un perfil de detección equivalente y una base analítica distinta. En este caso si el resultado fuera nuevamente no conforme, se actuará según lo establecido en el

apartado anterior (a). Si por lo contrario el resultado fuera conforme, la leche podrá descargarse con destino al consumo humano.



Figura 8. Diagrama de la realización de la prueba de detección de residuos de antibióticos en explotaciones ganaderas y centros lácteos

Fuente: MAPYA (2007)

Además, cuando el resultado de la primera prueba sea no conforme, el técnico de calidad comunicará el resultado al responsable del centro lácteo y éste a la base de datos Letra Q, así como el resultado de la segunda prueba, cuando decida llevarla a cabo. En cualquier caso, si el centro lácteo realiza una prueba de identificación y cuantificación de residuos de antibióticos, el resultado de dicha prueba se considerará definitivo, siempre y cuando se refiera al mismo espectro de antibióticos que la prueba *in situ*.

3.3.3. Toma de muestras de leche para controles de calidad

La toma de muestras de leche tiene como objetivo obtener una muestra representativa del volumen total que contiene el tanque o cisterna, ya que de ello dependerá la validez de los resultados analíticos obtenidos.

A este respecto, la Federación Internacional de Lechería mediante la norma FIL-ISO 50C:1995 establece las pautas a seguir para la toma de muestras de leche, su transporte y conservación. En España, el Real Decreto 1728/2007 especifica los requisitos y condiciones que se deben cumplir en la toma de muestras de leche procedentes de los tanques de refrigeración de las explotaciones ganaderas y de las cisternas de transporte a su llegada a los centros lácteos, así como las condiciones de almacenamiento y transporte de las muestras de leche hasta el laboratorio de control.

En primer lugar el Real Decreto indica que el responsable de la toma de muestras deberá haber recibido una formación adecuada, que se acreditará tras haber superado un curso validado por la autoridad competente. En el Anexo I del citado Real Decreto se recogen los contenidos mínimos que deben tratarse en los cursos de formación.

También para la toma de muestras, en el Real Decreto se señala que es conveniente realizar antes la homogenización de la leche del tanque o cisterna, para conseguir una buena mezcla de todos los componentes especialmente de la grasa, células somáticas y gérmenes y, de este modo, facilitar que la muestra sea lo más representativa posible.

En la explotación ganadera, la toma de muestras de leche será realizada por el responsable de la recogida (transportista o personal del centro lácteo). Se obtendrán, al menos, las muestras necesarias para garantizar un mínimo de dos muestras válidas al mes para cada parámetro de calidad comercial: grasa, proteína, extracto seco magro, así como para el recuento de gérmenes totales. En el caso de las células somáticas, se recogerá al menos una muestra válida al mes. Además se realizará *in situ* una prueba de detección de residuos de antibióticos.

Las muestras serán obtenidas del tanque de almacenamiento de la leche y serán conservadas y transportadas en refrigeración hasta el laboratorio de análisis. Cada bote o recipiente será marcado con una etiqueta identificativa individual, donde se incluirán los datos necesarios para permitir al laboratorio de análisis identificar correctamente la muestra y comunicar a la “base de datos Letra Q” los resultados.

A su vez, en los centros lácteos la toma de muestras de leche será realizada por el técnico de calidad que recogerá dos muestras de todas las cisternas antes de la descarga. Una de las muestras se enviará al laboratorio de análisis donde se determinarán el punto crioscópico, grasa, proteína, extracto seco magro, células somáticas, colonias de gérmenes a 30°C y presencia de residuos de antibióticos, mientras que la otra servirá para la prueba *in situ* de detección de residuos de

antibióticos. También en este caso, se deberán identificar con una etiqueta individual y se comunicarán los resultados de los análisis a la “base de datos Letra Q”.

Por otro lado, el Real Decreto 1728/2007 señala que podrá añadirse a la muestra de leche azidiol para su conservación, indicando en el Anexo I su composición (10 mL de etanol, 45 g de trisodio citrato 5,5 hidrato, 18 g de azida sódica, 0,75 g de cloranfenicol, 0,35 g de azul de bromofenol y 1000 mL de agua desionizada hasta completar) y su dosificación en la leche (133 µL de azidiol en 40 mL).

También, se establece, en el Apartado b del Anexo II, que durante el transporte y almacenamiento de las muestras de leche hasta su llegada a los laboratorios de análisis, en caso de no adicionar conservante a las muestras de leche la temperatura de conservación no podrá ser inferior a 0 °C ni superior a 4 °C, pero si el tiempo transcurrido entre la toma de muestras y el análisis es inferior a 24 horas la temperatura de conservación puede llegar hasta 6 °C. En cambio, si se le añade conservante a la muestra de leche la temperatura de conservación máxima podrá alcanzar los 8 °C.

4. MÉTODOS DE DETECCIÓN DE ANTIMICROBIANOS EN LA LECHE

4.1. Generalidades

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

Desde esa época se han mejorado ostensiblemente muchas de las características de estos métodos como la rapidez de respuesta, exactitud, sencillez y sensibilidad, al tiempo que se han desarrollado numerosos métodos basados en técnicas inmunológicas o receptores proteicos/microbianos que han reducido los tiempos de ensayo a escasos minutos. Las últimas tecnologías han integrado además las técnicas inmunoenzimáticas con aplicaciones electrónicas dando como resultado métodos basados en biosensores de alta especificidad y sensibilidad, que ofrecen un futuro prometedor dentro del campo de la detección de residuos en alimentos.

4.2. Clasificación de los métodos de detección de antimicrobianos

Actualmente, mediante la Decisión 2002/657/CE se clasifican los métodos analíticos de detección de sustancias en dos grupos en función de sus características

de funcionamiento. Así se agrupan en: métodos cualitativos como aquellos métodos que identifican sustancias basándose en sus propiedades químicas, biológicas o físicas, y métodos cuantitativos que determinan la cantidad o la fracción de la masa de una sustancia de forma que pueda expresarse como valor numérico.

A su vez, en dicha Decisión, basándose en la Directiva 96/23/CE, se realiza otra clasificación de los métodos de detección, como métodos de cribado y métodos de confirmación. El objetivo de los métodos de cribado es detectar la presencia de una sustancia al nivel de interés y se utilizan para analizar muestras en busca de resultados “no conformes”. En cuanto, a los métodos de confirmación son aquellos que proporcionan información total o complementaría que permiten identificar y en su caso, cuantificar de manera inequívoca la sustancia a nivel de interés.

En el caso concreto de la leche, los métodos de cribado más utilizados son los métodos microbiológicos capaces de detectar la presencia o ausencia de residuos en la muestra y los métodos de confirmación cualitativos (específicos) que permiten detectar de una forma más específica y por lo general más rápida, la presencia de residuos de antibióticos y sulfonamidas en la leche. Como métodos de identificación y confirmación cuantitativa se emplean con mayor frecuencia la cromatografía de gases o la cromatografía líquida.

Por otro parte, los laboratorios de referencia de análisis de residuos veterinarios han publicado el documento “Guidelines for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines” (CRLs, 2010) como complemento a la Decisión 657/2002/CE en lo referente a la validación de los métodos de cribado. En dicho documento se realizan dos clasificaciones de los métodos de detección de residuos de antibióticos, según sus características de funcionamiento o de acuerdo con su grado de cuantificación.

Así, según las características de funcionamiento se diferencian tres grupos:

- **Métodos biológicos**: se basan en la detección de la respuesta celular de los analitos (ej. métodos microbiológicos)
- **Métodos bioquímicos**: su respuesta se basa en interacciones moleculares entre los analitos y los receptores proteicos o anticuerpos (ej. ELISA)
- **Métodos físico-químicos**: son aquellos métodos que pueden distinguir la estructura química y características moleculares de los analitos (ej. cromatografía de gases o líquida).

Basándose en el grado de cuantificación se establecen también tres grupos:

- **Métodos cualitativos**: que indican la presencia o ausencia del analito (ej. métodos microbiológicos o métodos de unión a receptores proteicos)
- **Métodos semi-cuantitativos**: cuantifican de una forma aproximada la concentración de analito que hay en la muestra. Es el caso de aquellos métodos que incluyen una curva de calibración de un solo analito (ej. ELISA)
- **Métodos cuantitativos**: que permiten identificar la concentración del analito presente en la muestra (ej. métodos cromatográficos)

4.3. Métodos de cribado para la detección de antimicrobianos en la leche

4.3.1. Métodos microbiológicos

Los métodos microbiológicos de cribado fueron los primeros métodos utilizados para la detección de residuos de antibióticos. El primer método de este tipo fue desarrollado en el año 1952 (Mitchell y col., 1998; Navrátilová, 2008), siendo en la actualidad, uno de los grupos de métodos más utilizados (Pikemaat y col., 2009).

Se trata de métodos cualitativos, cuya finalidad es establecer la presencia o ausencia de residuos de antibióticos por encima de los Límites Máximos de Residuos permitidos (LMR). Además, deben ser capaces de detectar la presencia del mayor número de sustancias posibles a los niveles de interés establecidos para cada una de esas sustancias, en un amplio número de muestras y a costes bajos.

Los métodos microbiológicos están basados fundamentalmente en pruebas de inhibición del crecimiento de un microorganismo específico (microorganismo de prueba o “microorganismo test”), empleando para la detección de esta inhibición, diversos sistemas como indicadores de pH, redox, bioluminiscencia, etc., es decir, aprovechan fundamentalmente la capacidad de las bacterias de producir ácido, reducir colorantes o producir halos de inhibición en un medio de cultivo, de manera que el resultado se puede interpretar visualmente (Kantiani y col., 2009; Pikemaat y col., 2009).

Al tratarse de métodos inespecíficos pueden ser sensibles a otras sustancias de origen no medicamentoso, y que pueden interferir en el crecimiento del microorganismo de prueba, como pueden ser los inhibidores naturales o el nivel de células somáticas (Carlsson y Björck, 1989; Shiffmann y col., 1992; Althaus y col., 2003), residuos de detergentes y/o desinfectantes (Žvirauskiene y Salomskiene, 2007), plaguicidas, etc., por eso también se les conoce como métodos de detección de inhibidores.

En la Figura 9 se representa de forma resumida el fundamento de los estos métodos de detección. En el caso de que las muestras de leche no contengan antibiótico, las esporas del *Geobacillus stearothermophilus* germinan, crecen y metabolizan el azúcar, el ácido producido por la fermentación hace cambiar el color del indicador y el resultado se interpreta como negativo. Por el contrario si hay antibiótico en la muestra, no se fermenta la glucosa, no hay producción de ácido y el color permanece y de este modo la muestra se califica como positiva.

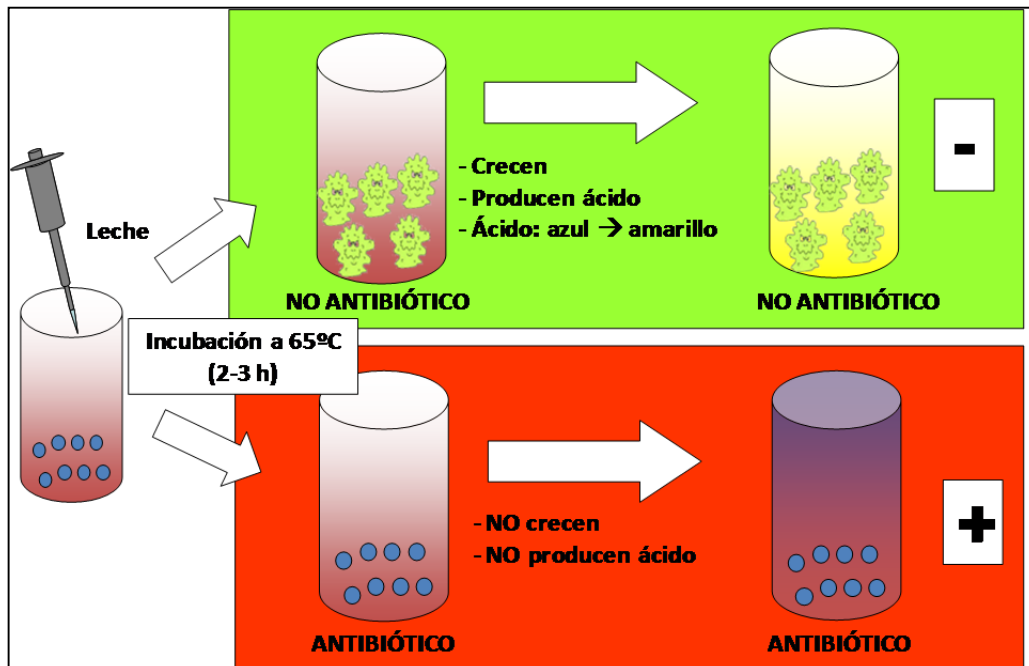


Figura 9. Principio de los métodos microbiológicos de detección de antibióticos en la leche

Las principales características (fabricante, distribuidor, versiones, tipo de indicador, temperatura y tiempo de incubación, interpretación de resultados y formato) de los métodos microbiológicos de cribado más utilizados en los laboratorios de control se presentan en el Cuadro 7.

Como se puede observar los métodos microbiológicos que se presentan se diferencian en el indicador, que puede ser el negro brillante (BRT) o el purpura de bromocresol, el tiempo y la temperatura de incubación, así como en el formato en el que se presentan.

Cuadro 7. Características de los métodos microbiológicos de cribado más utilizados en la detección de antibióticos en España

<i>Microbiológicos</i>						
Método	Fabricante/ Distribuidor	Versiones	Indicador	Incubación	Lectura	Formato
BRT	Analytik in Milch Produktions-und Vertriebs-GmbH, Munich, Alemania /Teknokroma	BRT Test, MRL, T	Negro brillante	65 °C 3 h - 3 h 15 min	Visual (cambio color) Instrumental (espectrofotómetro 450-620 nm)	Microplaca 96 análisis (entera o divisible) Tubos o ampollas individuales
Blue Yellow	Charm Sciences Inc, Massachussets, USA/Grupo Taper	Blue Yellow, Cowside	Púrpura de bromocresol	64 °C 3 h - 3 h 15 min	Visual (cambio color)	Microplaca 96 análisis (divisible) Tubos o ampollas individuales
Delvotest	DSM Food Specialties, Delf, Holanda /Alifarma	MCS, MCS Accelerator, SP-NT	Púrpura de bromocresol	64 °C 2 h - 2 h 30 min	Visual (cambio color) Instrumental (MCS: espectrofotómetro 550-690 nm; MCS Accelerator: Delvo Scan)	Microplaca 96 análisis (enteras y divisibles) Tubos o ampollas individuales
Eclipse	Zeu-Inmunotec, Zaragoza, España/ZEU- Inmunotec	50, 100, 3G, Farm	Púrpura de bromocresol	65 °C 2 h -2 h 30 min	Visual (cambio color) Instrumental (espectrofotómetro 590-650 nm)	Microplaca 96 análisis (entera o divisible) Tubos o ampollas individuales

En cambio, todos los métodos recopilados en el Cuadro 7 utilizan como microorganismo de prueba el *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* (antes denominado *Bacillus stearothermophilus*) debido a su rápido crecimiento a temperaturas altas y su elevada sensibilidad a los antibióticos betalactámicos, principalmente a la penicilina.

Esta sensibilidad los hace muy adecuados para el cribado de residuos de antibióticos en la leche, ya que como se ha comentado anteriormente los betalactámicos son los antibióticos más utilizados en diferentes tratamientos veterinarios del vacuno lechero (Zorraquino y col., 2007; Zorraquino, 2008). Por el contrario, son menos sensibles a otras sustancias como macrólidos, sulfonamidas, tetraciclinas o cloranfenicol (Katz y Siewierski, 1995; Botsoglou y Fletouris 2001; Kantiani y col., 2009; Navrátilová, 2009).

4.3.2. Métodos específicos (cualitativos de confirmación)

En este segundo apartado se agrupan aquellos métodos que permiten una detección más específica de los residuos de medicamentos presentes en la leche, bien de grupos de sustancias (betalactámicos, tetraciclinas, etc.) o bien de sustancias individuales (cloranfenicol, gentamicina, ceftiofur, etc.). Además son métodos que emplean menos tiempo de análisis (5-15 min) que los métodos microbiológicos, por lo que coloquialmente se les conoce como “métodos rápidos”.

En la actualidad existe una amplia variedad de estos métodos en el mercado, muchos de ellos validados por la FDA/AOAC y/o la IDF para su uso en leche cruda de vaca (FDA M-I-96-10 Revisión #3; AOAC, 2000; IDF 258/1991). La mayor parte de ellos se desarrollaron inicialmente para la detección específica de betalactámicos, si bien ahora hay disponibles un elevado número de versiones destinadas a la identificación específica de otras sustancias o grupos de antibióticos.

Los métodos rápidos de detección se clasifican en métodos enzimáticos (Penzym), inmunoenzimáticos (Técnicas ELISA y RIA), métodos de unión a receptores microbianos (Charm I y Charm II) y métodos de unión a receptores proteicos (Snap, Twinsensor, Rosa Charm, etc.).

Actualmente los métodos enzimáticos y los métodos de unión a receptores proteicos son los que se emplean con mayor frecuencia en España y sus principales características se resumen en el Cuadro 8. Como se observa en el Cuadro las casas comerciales presentan diferentes versiones de los métodos específicos, que son capaces de detectar antibióticos pertenecientes al grupo de los betalactámicos, a las tetraciclinas o métodos combinados que identifican antibióticos de ambos grupos.

Cuadro 8. Características de los métodos específicos o de confirmación cualitativa más utilizados en la detección de antibióticos en España

Método	Fabricante/ Distribuidor	Versiones	Organismo/ Receptor	Incubación	Lectura	Formato
Enzimáticos						
<i>Penzym</i>	UCB Bioproducts, Braine-L'Alleud, Bélgica /Larbus	100, S100	Enzima DD- carboxipeptidasa	47 °C 1ª: 5 min 2ª: 8 min	Visual (Comparación tabla colores).	Reactivos 100 análisis betalactámicos
Métodos de unión a receptores proteicos						
<i>Beta Star</i>	UCB Bioproducts, Braine-L'Alleud Bélgica / Chr. Hanssen	Beta Star TetraStar Beta Star Combo	Receptor proteico específico enlazados con partículas de oro	Beta Star 1ª: 3 min / 2ª: 2 min TetraStar 1ª: 3 min / 2ª: 2 min Beta Star Combo 1ª: 2 min / 2ª: 3 min	Visual (intensidad color muestra vs control) Instrumental (lector específico)	Tira reactiva (betalactámicos; tetraciclina; betalactámicos y tetraciclina)
<i>Delvo-X- Press</i>	DSM Food Specialties, Delft Holanda /Alifarma	Delvo-X-Press βL	Receptor proteico específico conjugado a una enzima	64 °C 1ª: 3 min 2ª: 3 min	Instrumental (lector específico)	Tubos con el receptor (Soluciones: Standard, Wash Solution, Tracer y Colour Developer)
<i>Rosa Charm</i>	Charm Sciences, Lawrence, Massachusetts, EEUU / Grupo Taper	Charm MRLBL Charm MRLTET Charm MRLBLTET	Inmunoreceptores específicos	56 °C 8 min	Visual (intensidad color muestra vs control) Instrumental (lector específico)	Tira reactiva (betalactámicos; tetraciclina; betalactámicos y tetraciclina)
<i>Snap</i>	IDEXX Laboratoires Inc., Westbrook, Maine, EEUU / Tecasa	Snap MRL Beta- Lactam Snap Tetracycline	Receptor proteico específico	45 °C 1ª: 5 min 2ª: 4 min	Visual (intensidad color muestra vs control) Instrumental (lector específico)	Dispositivo betalactámicos Dispositivo tetraciclina
<i>Twinsensor</i>	Unisensor, Lieja, Bélgica / ZEU-Immunotec	Twinsensor	Receptores proteicos y anticuerpos enlazados con partículas de oro	40 °C 1ª: 3 min 2ª: 3 min	Visual (intensidad color muestra vs control) Instrumental (lector específico)	Tira reactiva (betalactámicos y tetraciclina)

Todos los métodos específicos (Cuadro 8) se diferencian en la temperatura y el tiempo de incubación, así como en el formato en el que se presentan. Pero todos permiten realizar la interpretación visual de los resultados, el Penzym por cambio de color y los de unión a receptores por la intensidad de color. Además estos últimos ofrecen la posibilidad de realizar la lectura de resultados mediante equipos automáticos que proporcionan los resultados de forma objetiva.

En el caso de los métodos enzimáticos destaca el Penzym para la detección de betalactámicos. El principio de este método se basa, en una primera incubación en la que se pone en contacto la leche con la enzima DD-carboxipeptidasa, que será en menor o mayor grado dependiendo de la cantidad de antibiótico que contenga la muestra. Posteriormente, se realiza una segunda incubación en la que se adiciona una tableta que contiene un péptido de D-alanina y una enzima D-aminoácido oxidasa, necesarios para que tenga lugar una reacción enzimática en la que se liberan como productos finales ácido pirúvico y peróxido de hidrógeno. Estas sustancias reaccionan con un indicador de tipo oxido-reducción y se produce un cambio de color que se compara con una tabla estándar de colores que determina si la muestra es positiva o negativa (Figura 10).

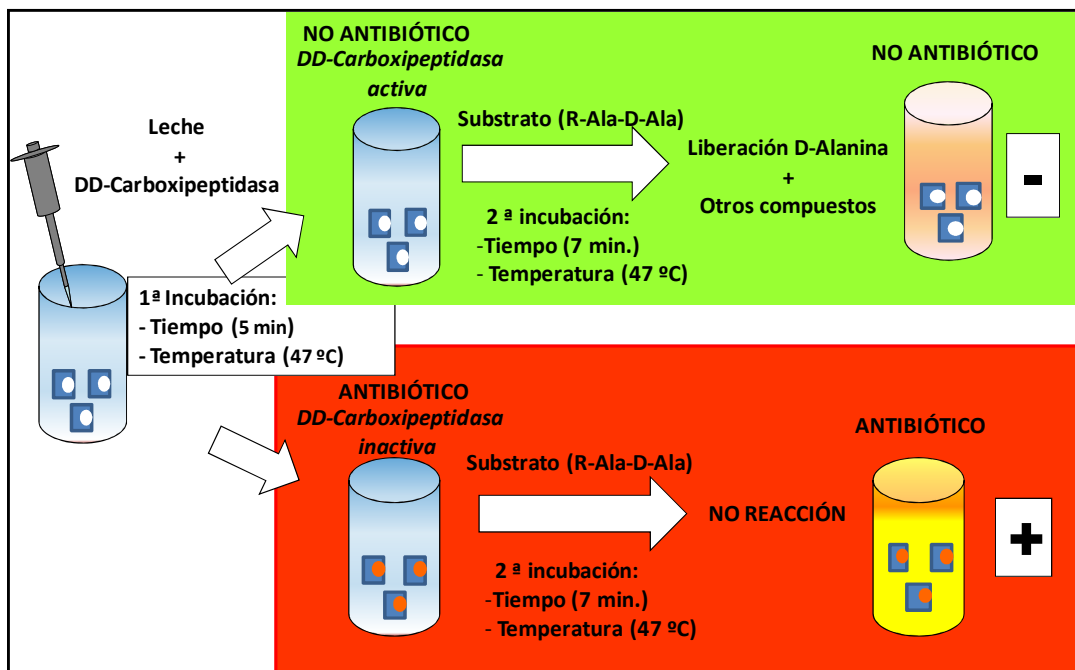


Figura 10. Principio del método enzimático Penzym de detección de antibióticos en la leche

El segundo grupo de métodos más empleado es el de unión a receptores proteicos, que están basados en la unión del antibiótico problema a receptores proteicos conjugados a una enzima y que son específicos para un grupo de antibióticos determinado.

En la Figura 11 se presenta un esquema del fundamento de los métodos de unión a receptores proteicos. En la gran mayoría de estos métodos hay una primera fase en la que se pone en contacto la muestra de leche con el receptor dando como resultado la interacción de los posibles antibióticos que contenga la muestra con el receptor.

En una segunda fase la muestra de leche junto con los receptores es transferida a un medio inmunocromatográfico, normalmente en forma de tira reactiva. Estas contienen una línea control y una línea para antibióticos betalactámico o para tetraciclinas, según el grupo para que sea específico, o combinados que permitan la detección simultánea de ambos grupos, en ese caso la tira reactiva presentara tres líneas (línea betalactámicos: BL, línea control: CTL y línea tetraciclinas: TET). Al añadir la tira reactiva en esta segunda fase es cuando la línea específica a antibióticos betalactámicos captura todos los receptores específicos a betalactámicos, que no han interaccionado con el antibiótico durante la primera fase y lo mismo ocurrirá con la línea para tetraciclinas.

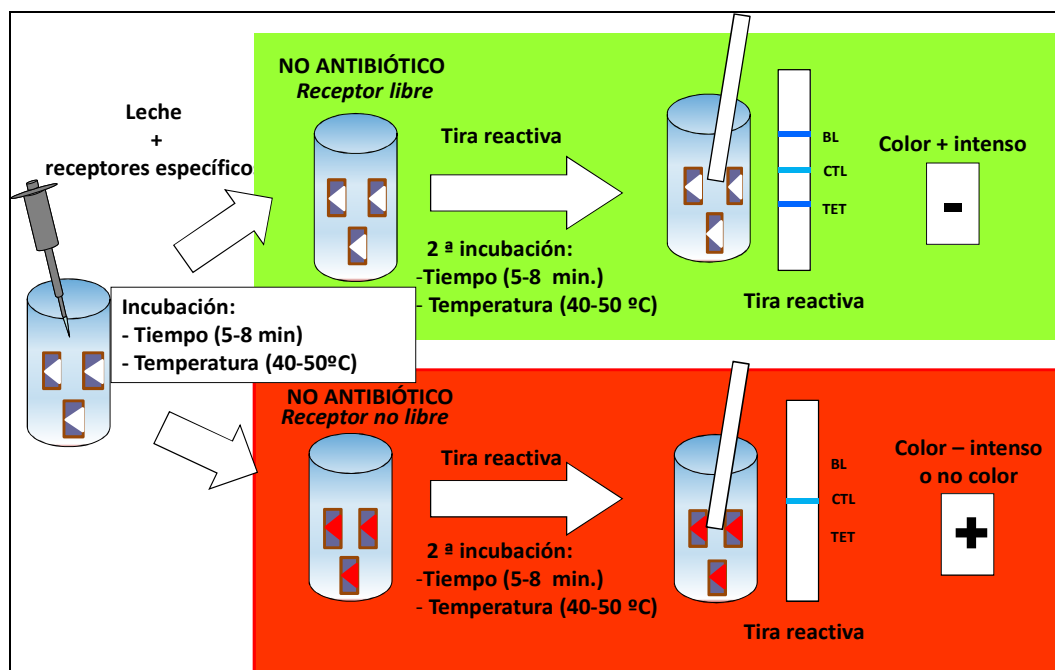


Figura 11. Principio de los métodos de unión a receptores proteicos de detección de antibióticos en la leche

La línea control sirve como referencia para determinar si la muestra es negativa o positiva. De modo que si la línea específica a betalactámicos o tetraciclinas es más intensa que la línea control, la muestra se considera negativa, y por el contrario si la línea de betalactámicos o tetraciclinas tiene una intensidad cercana, menor que la línea de control, la muestra se evalúa como positiva.

4.4. Criterios para la validación de los métodos analíticos

4.4.1. Generalidades

El objetivo de la validación de un método analítico es la confirmación mediante examen y puesta a disposición de pruebas efectivas de que cumple los requisitos particulares para su uso específico previsto (Decisión 2002/657/CE). En el Cuadro 9 se muestran las principales características de funcionamiento que se deben tener en cuenta para la validación de los distintos métodos analíticos según la Decisión 2002/657/CE de la Unión Europea.

Cuadro 9. Características de funcionamiento que deben determinarse para la validación de los métodos analíticos

Características	Métodos cualitativos		Métodos cuantitativos	
	Cribado	Confirmación	Cribado	Confirmación
Límite detección $CC\beta$	+	+	+	+
Límite decisión $CC\alpha$	-	+	-	+
Veracidad/ recuperación	-	-	-	+
Precisión	-	-	+	+
Selectividad/ especificidad	+	+	+	+
Aplicabilidad/ robustez/ estabilidad	+	+	+	+

+ = Determinación obligatoria

Fuente: Decisión 2002/657/EC

En los métodos cualitativos de cribado (“screening”) se deben evaluar únicamente los parámetros de límite de detección (CC β), selectividad y robustez. Aunque la guía “Guía para la descripción normalizada de ensayos de microbios inhibidores” UNE-EN ISO 13969 (ISO, 2003a) y la “Directrices para la descripción normalizada de inmunoanálisis o análisis de receptores para la detección de residuos antimicrobianos” UNE-EN ISO 18330 (ISO, 2003b) destacan además la importancia de llevar a cabo estudios de tipo colaborativos (reproducibilidad).

Como se ha comentado anteriormente los laboratorios de referencia Europeos han publicado el documento “Guidelines for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines” (CRLs, 2010) con el objetivo de establecer los requisitos mínimos necesarios para la validación de los métodos de cribado. La guía consta de dos fases, una primera fase de validación de los métodos en el propio laboratorio en el cual han sido desarrollados, para demostrar sus características de rendimiento, determinando la selectividad, el límite de detección CC β , la aplicabilidad, la robustez y la estabilidad del método. Y una segunda validación abreviada que deberán realizar los laboratorios que vayan emplear un determinado método, con el objeto de demostrar que el laboratorio receptor es capaz de aplicarlo correctamente, de manera que se determinara la selectividad y el límite de detección CC β empleando un número menor de muestras.

En cuanto a los estudios de reproducibilidad de un método, suelen realizarse para trabajos de validación colaborativa (Suhren y Heeschen., 1994; Suhren, 1995; Suhren, 1997), ya que consiste en evaluar la repetibilidad de los resultados del método sobre un material problema idéntico, pero llevado a cabo por diferentes laboratorios, técnicos, equipos e instalaciones.

Por otro lado, la robustez es una característica empleada habitualmente para el desarrollo de los métodos, con el objetivo de demostrar que los resultados no se vean afectados por pequeñas variaciones del método, como la modificación del tiempo de incubación (Luitz y Suhren, 1995 a,b; Reybroeck, 1995 a,b; Molina y col., 1999) y/o cambios en las diferentes sustancias que componen los métodos (Nagel y col., 2009).

A continuación, se desarrollarán con más detalle algunas de las características de funcionamiento que se han tenido en cuenta en este estudio: límite de detección o capacidad de detección CC β , sensibilidad y selectividad.

4.4.2. Límite de detección o capacidad de detección CC β

4.4.2.1. Generalidades

Según la Directiva 2002/657/CE, se entiende por límite de detección o capacidad de detección CC β al “*contenido mínimo de la sustancia que puede ser detectado, identificado o cuantificado en una muestra, con una probabilidad de error β . En el caso de sustancias para las que no se ha establecido un límite permitido, la capacidad de detección es la concentración mínima en la que un método puede detectar muestras realmente contaminadas con una certeza estadística de $1 - \beta$. En el caso de sustancias para las que se ha establecido un límite permitido, la capacidad de detección es la concentración en la que un método puede detectar límites de concentración permitidos con una certeza estadística de $1 - \beta$* ”.

Por otro lado, las normas UNE-EN ISO (ISO, 2003 a, b) establecen un procedimiento para el cálculo de los límites de detección de los métodos.

Para ello, en primer lugar se debe garantizar la calidad de la leche que se empleará para preparar las muestras de leche adicionadas de antibióticos. A este respecto, las normas destacan que las muestras de leche que serán utilizadas como “control negativo” deben proceder de vacas que cumplan los siguientes requisitos:

- Buen estado de salud clínica y subclínica, con especial énfasis a la salud de las ubres (menos de 150.000 células por mililitro), libre de sustancias antimicrobianas y/o alimentación con antibióticos desde al menos 8 semanas antes de la recogida de la leche.
- Encontrarse a mitad del período de lactación (> 60 días y < 200 días del destete) y tener una producción superior a los 5 kg leche por día.
- Recuento bacteriológico inferior a 10^4 ufc/ml (antes del proceso de conservación: congelación, liofilización, etc.).

Para la construcción de la curva dosis-respuesta, ambas normas (ISO, 2003 a, b) establecen que deben ensayarse al menos cuatro concentraciones diferentes entre el control negativo y la concentración que se espera que sea positiva, las cuales deben estar distribuidas en forma equidistante entre ellas según una escala lineal o logarítmica. Además, debe incluirse una concentración que sea al menos 1,5 a 2 veces superior al valor positivo esperado y una concentración equivalente al LMR del antibiótico. Para cada concentración de antibiótico, deben analizarse 10 a 20 repeticiones cuando se efectúan calificaciones visuales. Sin embargo, en caso de

utilizar lectores fotométricos, el número de repeticiones disminuye a una cantidad comprendida entre 3 y 5 muestras.

En la Figura 12 se representa el modelo de curva de dosis-respuesta para el cálculo de los límites de detección que se pone como ejemplo en las citadas normas (ISO, 2003 a, b).

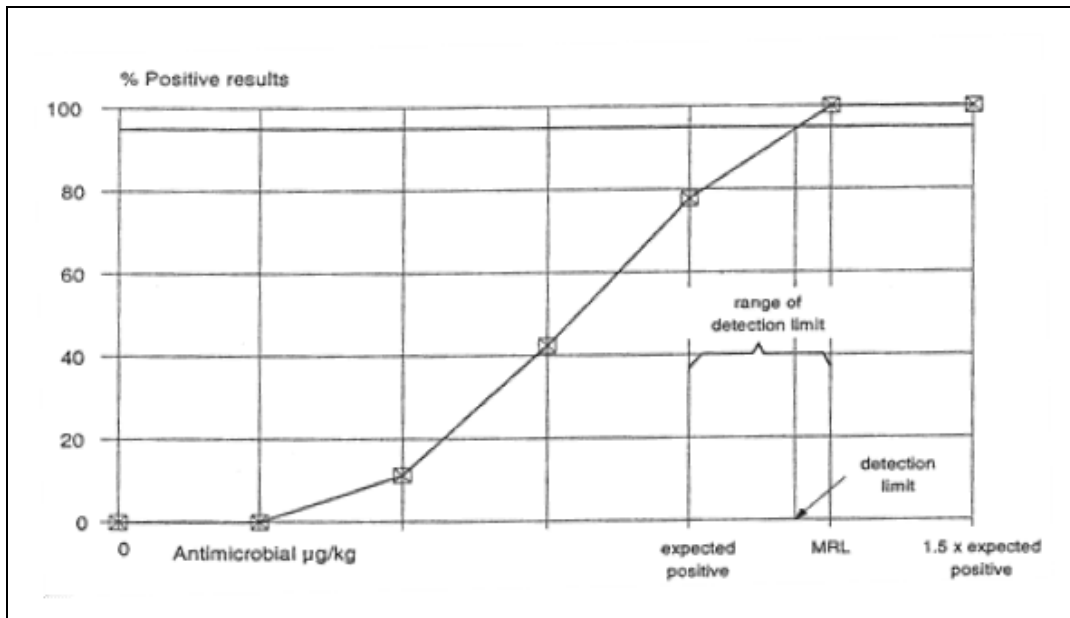


Figura 12. Modelo de curva dosis-respuesta para el cálculo del límite de detección de los métodos de cribado

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

A continuación, se calcula las frecuencias relativas de resultados positivos para cada concentración de antibiótico y se construye la curva dosis-respuesta. El límite de detección se calcula como *“la concentración que corresponde a la intersección de la curva dosis respuesta con la línea que representa el 95% de resultados positivos”*.

Utilizando esta definición, el límite de detección puede expresarse de dos formas, las dos concentraciones analizadas que rodean al valor que proporciona el 95% de resultados positivos ($>\mu\text{g/Kg}$ - $< \mu\text{g/Kg}$) o como la concentración que corresponde a la intersección de la curva dosis respuesta con la línea que representa el 95% de resultados positivos.

Algunos autores (Althaus y col., 2002, Molina y col., 2003b; Montero y col., 2005; Linage y col., 2007; Sierra y col., 2009a, b) calculan el límite de detección modelando la curva “dosis-respuesta” mediante la aplicación de un modelo de regresión logístico y calculan a partir de dicha curva el límite de detección como el criterio del 95% de resultados positivos.

En caso de emplearse lecturas fotométricas, el límite de detección se calcula como el valor de la concentración para el cual se alcanza el 45% de la máxima absorbancia relativa porcentual (Luitz y col., 1995; Luitz y col., 1995 a; Schliephake, 1995; Suhren, 1995).

También en dichas normas se presentan otro tipo de gráficos, para los casos en los que se pretenda representar el patrón de detección de un método analítico para diferentes sustancias antimicrobianas. En la Figura 13 se presenta un ejemplo de los gráficos planteados en las normas. En dicho gráficos se representa para un mismo método diferentes antibióticos de manera que cada línea del gráfico equivale a una concentración de antibiótico (10 LMR; LMR; 0,1 LMR). De esta manera se puede observar gráficamente si el método es capaz de detectar una sustancia por debajo, igual o por encima del LMR.

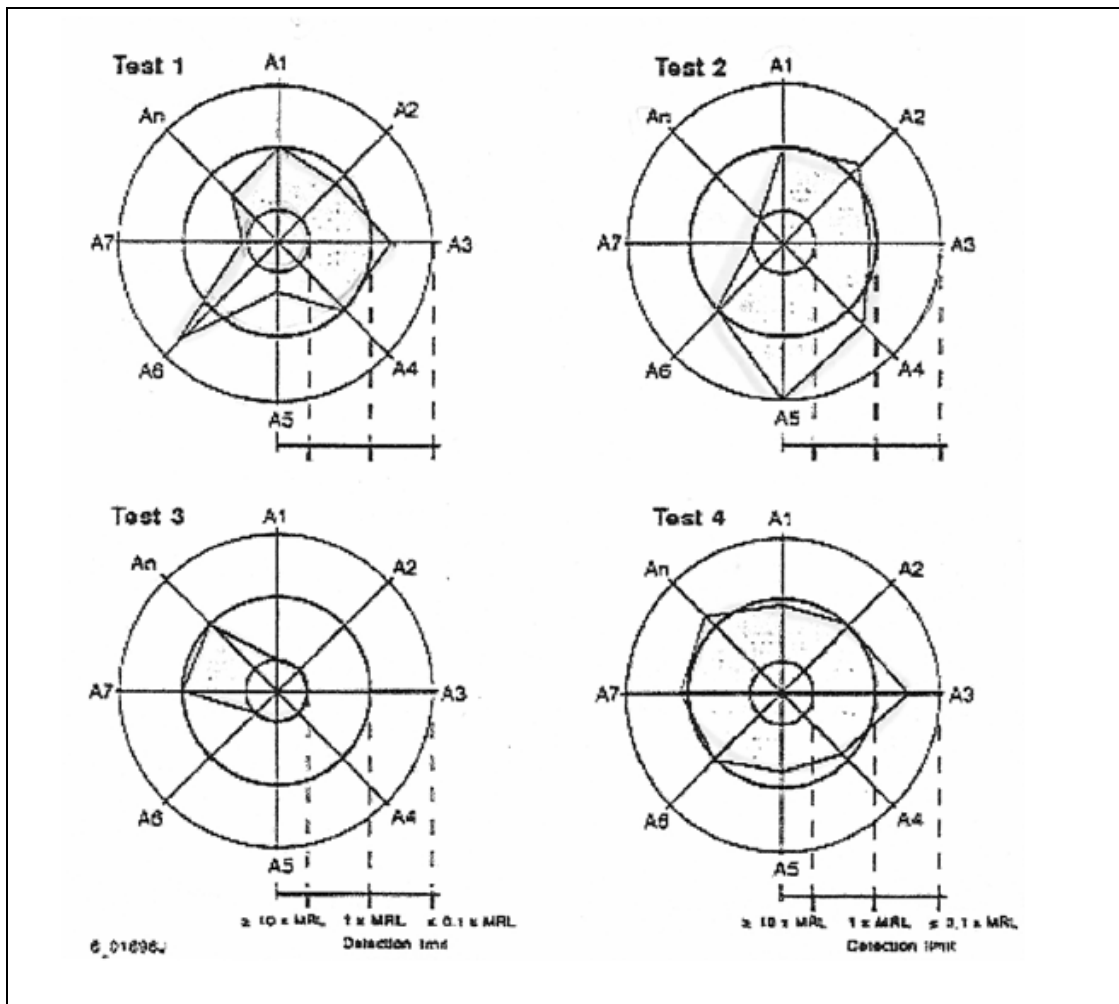


Figura 13. Perfil de detección de métodos analíticos para diferentes sustancias antimicrobianas

Fuente: UNE-EN ISO 13969 (2003a)

Por otro lado, el procedimiento establecido para el cálculo de la capacidad de detección $CC\beta$ según la guía CRLs (2010) es diferente simplificando el cálculo, ya que fijando previamente solo una concentración de estudio, en base al LMR de la sustancia que se quiere ensayar, se determinarían el número de muestras necesarias para obtener el $CC\beta$ al 95% de significación estadística.

4.4.2.2. Límites de detección de los métodos microbiológicos

En el Cuadro 10 se han resumido los límites de detección (LD) señalados por las casas fabricantes para diferentes sustancias pertenecientes a distintos grupos de antimicrobianos, junto a los LMRs establecidos por la Unión Europea.

Como se puede apreciar en el Cuadro, en general todos los métodos presentan límites de detección cercanos o inferiores a los LMRs en el caso de los antibióticos betalactámicos, por lo que se trata de métodos muy adecuados para la detección de este grupo de antibióticos.

Sin embargo, los límites de detección estimados para otros grupos como las tetraciclinas son superiores a los LMRs. Por ello, como consecuencia de la aplicación del RD 1728/2007 en el que se especifica, tanto para las pruebas de antibióticos realizadas en la explotación como en los centros lácteos, que los métodos utilizados deberán ser capaces de detectar al menos la amoxicilina, ampicilina y la oxitetraciclina, algunas casas comerciales han desarrollado métodos que presentan una mayor sensibilidad para la detección de tetraciclinas, como es el caso del método BRT Inhibitor Test T (BRT Test T).

En el caso de las sulfamidas los límites de detección de los métodos microbiológicos son por lo general inferiores o cercanos a los LMRs excepto en el método BRT versiones BRT Inhibitor Test y BRT Inhibitor Test T.

Para los macrólidos y aminoglucósidos (Cuadro 10 cont.), excepto para la tilosina, los límites establecidos para la mayoría de los métodos son superiores a los Límites Máximos de Residuos, por lo que sería necesario mejorar la sensibilidad de estos métodos para una detección adecuada de este tipo de sustancias.

Cuadro 10. Límites de detección (µg/kg) para sustancias antimicrobianas indicadas por los fabricantes para los métodos microbiológicos

Antibiótico	LMR	Delvotest			BRT			Eclipse				Blue Yellow	
		SP	SP-NT	MCS	BRT Test	BRT Test T	BRT MRL	50	100	PLUS	3G		
Betalactámicos													
Benzilpenicilina	4	2	1-2	2	2-3	2-3	1,5-2	4	4	4	-	-	3-4
Ampicilina	4	2-3	4	3	2-3	2-3	2-3	5	4	4	3	3	5
Amoxicilina	4	2	2-3	2-3	2-3	2-3	2-3	5	5	4	3	3	5-6
Oxacilina	30	5	10	≥5	10-20	10-20	5-10	25	25	-	10	10	-
Cloxacilina	30	15	20	≥10	20-30	10-20	10-20	40	-	-	20	20	30-50
Dicloxacilina	30	10	10	≥5	10-20	10-20	5-10	-	-	-	-	-	-
Nafcilina	30	5	-	-	10-15	10-15	5-10	-	-	-	-	-	-
Cefapirina	60	5	4-6	5	4-5	4-5	4-5	8	8	5	-	-	10
Ceftiofur	100	<50	25-50	25	50-100	50-100	50-100	-	-	-	-	-	50-100
Cefoperazona	50	40	-	-	200-300	25-50	20-30	-	-	-	-	-	-
Cefalexina	100	40-60	-	-	200-300	200-300	100-200	75	75	80	60	60	-
Cefalonio	20	5-10	-	-	10-20	10-25	10-15	-	-	-	-	-	-
Cefazolina	50	-	-	-	10-25	10-25	10-25	-	-	-	-	-	-
Cefquinoma	20	-	-	-	100-200	100-200	80-100	-	-	-	-	-	-
Cefacetilo	125	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tetraciclinas													
Tetraciclina	100	100	250-500	≥100	200-400	100	100-200	150	150	100	100	100	-
Oxitetraciclina	100	100	250-500	≥100	500-750	100	250-500	150	100	100	50	50	300
Clortetraciclina	100	100-150	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sulfamidas													
Sulfametazina	100	25	25-100	≥75	500-750	1500-2500	100-300	200	200	150	150	150	-
Sulfadimetoxina	100	50	-	-	500-750	1000-1500	100	-	-	-	-	-	50
Sulfatiazol	100	50	-	-	200-400	500-1000	100	75	75	60	50	50	-
Sulfadiacina	100	50	25-50	25	500-750	1000-1500	100	-	-	-	100	100	-

Cuadro 10 (Cont.). Límites de detección (µg/kg) para sustancias antimicrobianas indicadas por los fabricantes para los métodos microbiológicos

Antibiótico	LMR	Delvotest			BRT			Eclipse				Blue Yellow	
		SP	SP-NT	MCS	BRT Test	BRT Test T	BRT MRL	50	100	PLUS	3G		
Macrólidos													
Eritromicina	40	50	40-80	≥50	40-60	40-60	40-60	400	300	150	200	-	-
Espiramicina	200	200	400-600	≥500	400-600	400-600	200-400	-	1000	400	-	-	-
Tilimicosina	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tilosina	50	10-20	30	30	25-50	25-50	25-50	100	80	60	40	75-100	-
Aminoglucósidos													
Gentamicina	100	100-300	50	≥150	200-300	200-300	100-200	200-300	500	200	>1000	300-400	-
Neomicina	1500	100-200	100-200	≥200	500-750	500-750	500-750	-	1500	300	>1000	-	-
Kanamicina	150	2500	-	-	-	-	-	-	6000	3000	-	-	-
DH/Estreptomina	200	300-500	-	-	100-1500	1000-1500	400-600	-	2500	1500	-	-	-
Quinolonas													
Enrofloxacina	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Flumequina	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Otros													
Cloranfenicol*	0*	2500	-	-	5000-7500	5000-7500	2500-5000	-	-	-	5000	-	-
Trimetoprim	50	50	50-100	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dapsona*	0*	1	0,5-1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*Sustancias prohibidas (Reglamento UE 37/2010)

En la detección de las quinolonas ningún fabricante muestra, para los métodos microbiológicos expuestos en el Cuadro 10 límites de detección, debido posiblemente a la baja sensibilidad que presenta el *G. stearothermophilus* a este grupo de sustancias. Por ello, Zeu-Inmunotec, S.L (Zaragoza, España) ha desarrollado el método microbiológico Equinox que utiliza como microorganismo de prueba *Escherichia coli* ya que posee una mayor sensibilidad a las quinolonas. Este método presenta los siguientes límites de detección para leche de vaca: enrofloxacin 200 µg/Kg, sarafloxacin 300 µg/Kg, norfloxacin 200 µg/Kg, ciprofloxacina 50 µg/Kg y marbofloxacina 150 µg/Kg.

También diversos autores han calculado los límites de detección de diferentes antimicrobianos de los métodos microbiológicos. En el caso de los métodos BRT y Delvotest se han resumido los principales trabajos encontrados en la bibliografía en los Cuadros 11 y 12, respectivamente.

En general, los trabajos de distintos autores también han observado una marcada diferencia en los valores de los límites de detección para cada grupo de fármacos, encontrando LD inferiores o iguales a los LMR para la mayoría de los antibióticos betalactámicos ensayados (Charm y Ruth, 1993; Frank, 1995; Žirdauskienė y Šalomskienė, 2006; Le Breton y col., 2007), tanto en la leche de vaca como en la de otras especies como la oveja (Althaus y col., 2001; Molina y col., 2003b) y la cabra (Sierra y col., 2009a, b). En cuanto al resto de sustancias antimicrobianas pertenecientes a los grupos de los aminoglucósidos, macrólidos, tetraciclinas y sulfamidas, existen marcadas diferencias entre los límites de detección establecidos por las casas fabricantes (Cuadro 10) y por diferentes autores (Cuadro 11 y 12).

Para otros métodos microbiológicos como es el caso del el Blue Yellow o Eclipse 100, debido al limitado número de trabajos encontrados no se ha realizado cuadro resumen. Además, en ambos métodos los estudios encontrados se han realizado en leche de otras especies diferentes a la vaca (Blue Yellow: Linage y col, 2006; Eclipse 100: Sierra y col., 2009 a, b).

Así, Linage y col. (2007) obtienen para el Blue Yellow en leche de oveja límites de detección inferiores a los LMRs para la penicilina G (3-4 µg/Kg), ceftiofur (96-107 µg/Kg), neomicina (915-1084 µg/Kg) y tilosina (44-51 µg/Kg), en cambio para el resto de sustancias estudiadas pertenecientes al grupo de penicilinas, cefalosporinas, aminoglucósidos, macrólidos, sulfamidas, tetraciclinas y quinolonas los límites calculados resultaron superiores a los LMRs.

Cuadro 11. Límites de detección ($\mu\text{g}/\text{Kg}$) de sustancias antimicrobianas calculadas por diferentes autores para el método Brilliant Reduction Test (BRT)

Antibiótico	Jaskch (1988)	Charm y Ruth (1993)	Heeschen (1993)	Frank (1995)	Heeschen y Büthgen (1995)	Luitz y Suhren (1995a)	Zaadhof y col. (1997)	Zorraquino (1998)	Althaus y col. (2001) ¹	Molina y col. (2003b) ¹	Sierra y col. (2009a,b) ²
Betalactámicos											
Benzilpenicilina	6	10	6-7	1-2	1,5	-	2-3	2-3	1	2	2
Ampicilina	10	10	5	2-4	5	-	-	4-5	6	6	3
Amoxicilina	5-10	5	-	2-4	-	-	-	5-6	6	6	4
Oxacilina	20	-	-	5-10	-	-	-	-	-	-	8
Cloxacilina	40	100	35	15-20	35	-	20-30	20-25	51	51	27
Dicloxacilina	20	-	-	-	-	-	-	20-30	-	-	8
Nafcilina	20	-	11	-	11	-	-	-	-	-	-
Cefapirina	-	10	-	-	-	-	-	9-10	-	-	-
Ceftiofur	80	100	-	-	-	-	-	150-200	120	120	-
Cefoperazona	-	-	-	-	-	-	-	42	92	92	44
Cefalexina	-	-	-	-	-	-	-	250	270	270	336
Cefalonio	-	-	-	-	-	-	-	10-15	-	-	-
Cefazolina	-	-	-	-	-	-	-	200-300	-	-	-
Cefquinoma	-	-	-	-	-	-	-	-	230	230	170
Cefacetilo	-	-	-	-	-	-	-	-	69	69	334
Cefalosporina C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.330	-
Tetraciclinas											
Tetraciclina	-	-	400	2.000-5.000	450	400	-	1.900	-	6.200	1.142
Oxitetraciclina	-	1.000	500	1.500-5.000	-	500	500-1.500	1.500	-	5.500	1.142
Clortetraciclina	-	-	450	-	-	450	-	3.200-3.500	-	-	35.969
Doxiciclina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	390	743
Sulfamidas											
Sulfametazina	-	1.500 -2.500	100-1.000	15.000-50.000	100-1.000	-	-	4.800-5.100	-	-	555
Sulfadimetoxina	-	-	100-1.000	-	100-1.000	-	-	-	-	-	844

¹Límites de detección calculados en leche de oveja; ²Límites de detección calculados en leche de cabra

Cuadro 11 (cont.). Límites de detección (µg/Kg) de sustancias antimicrobianas calculadas por diferentes autores para el método Brilliant Reduction (BRT)Test

Antibiótico	Jaskch (1988)	Charm y Ruth (1993)	Heeschen (1993)	Frank (1995)	Heeschen y Büthgen (1995)	Luitz y Suhren (1995a)	Zaadhof y col. (1997)	Zorraquino (1998)	Althaus y col. (2001) ¹	Molina y col. (2003b) ¹	Sierra y col. (2009a, b) ²
Sulfadoxina	-	-	100-1.000	-	100-1.000	-	-	-	-	-	-
Sulfatiazol	-	200-500	100-1.000	5.000-10.000	100-1.000	-	-	-	-	-	-
Sulfanilamida	-	-	100-1.000	-	100-1.000	-	-	-	-	-	-
Sulfadiazina	-	-	100-1.000	-	100-1.000	-	-	-	-	5.400	-
Sulfanilamide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	749
Sulfametoxazol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.200	-
Sulfametoxipiridazina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6.500	-
Sulfaquinoxalina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6.200	-
Macrólidos											
Eritromicina	-	1.000	2.500	-	225	-	-	-	-	630	174
Espiramicina	-	-	-	1.000-1.500	-	-	-	-	-	-	482
Tilosina	-	50	-	50-100	-	-	-	68.000	-	120	70
Tilmicosina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	264
Aminoglucósidos											
Gentamicina	-	>500	-	400-1.000	-	-	-	14.000	-	1.200	353
Neomicina	-	>500	22.000	-	300	-	-	15.000	-	3.700	909
Kanamicina	-	-	28.000	-	-	-	-	10.200	-	-	6.179
Estreptomicina	-	1.000	-	1.500	-	-	-	-	-	6.000	1.400
Spectinomycin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5.867
Quinolonas											
Enrofloxacina	-	-	-	400-10.000	-	-	-	-	-	-	3.749
Norfloxacina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7.972
Ciprofloxacina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.487
Flumequina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	84.830
Otros											
Cloranfenicol	-	-	15.000	-	15.000	-	-	-	-	22.000	-
Espectinomicina	-	-	13.000	4.000-5.000	-	-	-	1.300	-	-	-
Rifamicina	-	-	140	-	-	-	-	-	-	-	-
Trimetoprim	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.100	-

¹Límites de detección calculados en leche de oveja; ²Límites de detección calculados en leche de cabra

Cuadro 12. Límites de detección (µg/Kg) de sustancias antimicrobianas calculadas por diferentes autores para el método Delvotest

Antibiótico	Charm y Ruth (1993)	Honkanen y Reybroeck (1995)	Lacroix (1995)	Luitz y Suhren (1996)	Luitz y col. (1996)	Sischo (1996)	Gist Broscades (1997)	Zaadhof y col. (1997)	Athaus y col. (2001) ¹	Sierra y col. (2009 a,b) ²
Betalactámicos										
Benzilpenicilina	2,5	3	3	-	-	3	3	2,5	1,4	
Ampicilina	10	6	4	-	3	10	5	-	3	2
Amoxicilina	10	6	3	-	-	8	5-6	-	5	4
Oxacilina	-	-	-	-	-	-	10	-	-	4
Cloxacilina	50	25	20	-	20	30	25	20-25	23	7
Dicloxacilina	-	-	-	-	-	-	20	-	-	23
Nafcilina	-	-	-	-	-	-	10	-	-	21
Cefapirina	10	-	8	-	-	8	8-10	-	-	-
Ceftiofur	50	50	50	-	-	50	-	-	59	-
Cefoperazona	-	-	-	-	-	-	8	-	41	-
Cefalexina	-	-	-	-	-	-	6-10	-	68	44
Cefquinoma	-	-	-	-	-	-	15-20	-	-	57
Cefadroxil	-	-	-	-	-	-	-	-	63	-
Cefuroxime	-	-	-	-	-	-	-	-	41	57
Cefalosporina C	-	-	-	-	-	-	-	-	610	44
Tetraciclinas										
Tetraciclina	420	-	-	400	-	-	200-300	-	450	-
Oxitetraciclina	200	1.000	-	500	350	-	300	400-500	420	1.142
Clortetraciclina	420	-	-	450	-	-	200-300	-	-	743
Doxiciclina	-	-	-	-	-	-	-	-	290	12.339
Sulfamidas										
Sulfametazina	>1.000	-	-	-	-	-	-	-	-	434
Sulfadimetoxina	>1.000	-	-	-	25	-	-	-	-	183
Sulfatiazol	>1.000	-	-	-	-	-	-	-	-	66
Sulfanilamida	-	-	-	-	-	-	-	-	353	-

¹Límites de detección calculados en leche de oveja; ²Límites de detección calculados en leche de cabra

Cuadro 12 (cont.). Límites de detección ($\mu\text{g}/\text{Kg}$) de sustancias antimicrobianas calculadas por diferentes autores para el método Delvotest

Antibiótico	Charm y Ruth (1993)	Honkanen y Reybroeck (1995)	Lacroix (1995)	Luitz y Suhren (1996)	Luitz y col. (1996)	Sischo (1996)	Gist Broscades (1997)	Zaadhof y col. (1997)	Athaus y col. (2001) ¹	Sierra y col. (2009 a,b) ²
Sulfametoxazol	-	-	-	-	-	-	-	-	110	-
Sulfametoxipiridazin	-	-	-	-	-	-	-	-	430	-
Sulfaquinoxaline	-	-	-	-	-	-	-	-	790	-
Macrólidos										
Eritromicina	400	-	-	-	-	-	500-1.500	-	980	174
Espirimicina	-	-	-	-	700	-	-	-	-	482
Tilosina	100	50	-	-	-	-	100-300	-	120	23
Tilmicosina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	264
Aminoglucósidos										
Gentamicina	150	200	-	-	-	-	1.000-4.000	-	1.200	353
Neomicina	150	-	-	-	800	-	1.000-5.000	-	3.300	482
Kanamicina	>1.000	-	-	-	-	-	-	-	-	4.901
Estreptomicina	-	1.500	-	-	2.500	-	-	2.500-10.000	10.000	1.400
Streptomycin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.930
Quinolonas										
Enrofloxacina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.749
Norfloxacina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5.152
Ciprofloxacina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.733
Flumequina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	67.235
Otros										
Cloranfenicol	-	7.500	-	-	-	-	5.000-7.500	-	-	-
Espectomicina	-	-	-	-	-	-	5.000	-	23.000	-
Rinfamicina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trimetoprim	-	-	-	-	250	-	500-1.500	-	8.600	-

¹Límites de detección calculados en leche de oveja; ²Límites de detección calculados en leche de cabra

En el Eclipse 100, Sierra y col. (2009a) a partir de muestras del leche de cabra calcularon los límites de detección de 10 de antibióticos betalactámicos (penicilina G, ampicilina, amoxicilina, cloxacilina, oxacilina, dicloxacilina, cefadroxil, cefalexina, cefoperazona y cefuroxima). Para la ampicilina, amoxicilina, cloxacilina y cefoperazona los límites obtenidos fueron superiores a los LMRs, 5; 5; 42; 97, respectivamente. También estos autores (Sierra y col., 2009b) obtuvieron límites de detección para otras sustancias no pertenecientes al grupo de los betalactámicos. En este caso, el método Eclipse 100 no fue capaz de detectar ninguna de las sustancias de aminoglucósidos, macrólidos, tetraciclinas, sulfamidas y quinolonas por debajo o a los Límites Máximos de Residuos establecidos por la legislación.

4.4.2.3. Límites de detección de los métodos específicos

En el caso del método enzimático Penzym y los métodos de unión a receptores proteicos (Beta Star, Delvo-X-Press, Rosa Charm, Snap y Tetrasensor-Twinsensor) en el Cuadro 13 se recogen los límites de detección indicados por los fabricantes. En general, estos métodos al ser específicos para la detección de una sustancia o grupo de sustancias sus límites de detección resultan más ajustados. Por ello en todos los casos son inferiores o iguales a los LMRs establecidos por la legislación tanto para los antibióticos betalactámicos como para las tetraciclinas, lo que les hace muy adecuados para el análisis de estos antibióticos.

Para el método Penzym, otros autores también han calculado los límites de detección, y coinciden con lo indicado por la casa fabricante. Se trata de un método muy específico que permite detectar concentraciones pequeñas de unos 5 µg/Kg de amoxicilina, ampicilina, cefapirina y penicilina (Charm y Ruth, 1993; Senyk y col., 1990; Suhren y col., 1996; Sischo, 1996), aunque en el caso de la ampicilina las concentraciones calculadas por este método varían entre los autores, desde 4-5 µg/Kg (Gandino y Chiappetta, 1998) a 10-18 µg/Kg (Charm y Ruth, 1993; Suhren y col., 1996; Hozová y Kratmüllerová, 2001).

No obstante, otros autores presentan límites de detección mayores como por ejemplo la cloxacilina que debe estar presente en concentraciones de 40-80 µg/Kg para ser detectada por el método Penzym (Jaskch, 1988), 55 µg/Kg (Suhren y col., 1996) o 80-120 µg/Kg (Senyk y col., 1990).

Cuadro 13. Límites de detección (µg/Kg) para sustancias antimicrobianas indicados por los fabricantes para los métodos específicos

Antibiótico	LMR	PENZYM		BETA Star		DELVO XP	Rosa Charm				TWINSENSOR		Snap		
		100	S100	100	Combo		100	SL	SL	MRL	MRLBL/TET	TWINSSENSOR	MRL	TET	New
Betalactámicos															
Benzilpenicilina	4	4-6	2-4	2-4	-	2-4	3,6	4,2	2-3	-	2-3	2-3	2-3	-	-
Ampicilina	4	4-7	3-4	2-5	2-3	4-8	8,5	9,6	2,5-4	2,5-4	3-5	3-5	4-6	-	-
Amoxicilina	4	4-6	3-4	2-4	2-3	4-8	5,6	7,1	2,5-4	2,5-4	3-5	3-5	7-8	-	-
Oxacilina	30	30-50	20-30	5-10	-	25-50	-	-	-	-	-	-	40-60	-	-
Cloxacilina	30	60-100	30-70	5-10	5-10	30-60	50	8,3	25-35	25-35	6-8	6-8	30-40	-	-
Dicloxacilina	30	-	-	5-10	-	25-50	-	-	20-30	20-30	-	-	20-25	-	-
Nafcilina	30	-	-	8-20	-	-	-	-	-	-	-	30-40	70	-	-
Cefapirina	60	5-7	3-5	-	5-10	4-8	13,7	18,7	4-8	4-8	6-8	6-8	10-12	-	-
Ceftiofur	100	40-70	20-40	75-150	75-100	4-8	46,2	37,5	20-50	10-20	10-15	10-15	5-7	-	-
Cefoperazona	50	-	-	-	-	-	-	-	3-6	4-8	3-4	3-4	10-15	-	-
Cefalexina	100	20-40	15-25	-	-	25-50	-	-	15-30	15-30	-	-	20-25	-	-
Cefalonio	20	10-15	4-8	7,5-15	-	3-4	-	-	3-5	8-16	-	-	3-5	-	-
Cefazolina	50	-	-	8-16	-	-	-	-	8-16	8-16	-	-	15-20	-	-
Cefquinoma	20	-	-	-	-	5-20	-	-	15-20	15-20	-	-	20	-	-
Cefacetilo	125	-	-	-	-	-	-	-	6-12	6-12	-	-	50	-	-
Tetraciclinas															
Tetraciclina	100	-	-	-	50	-	-	-	7-15	-	40-50	40-50	-	20	50
Oxitetraciclina	100	-	-	-	25-50	-	-	-	50-100	10-30	30-40	30-40	-	30	50
Clortetraciclina	100	-	-	-	25-50	-	-	-	50-100	50-100	25-30	25-30	-	30	100
Doxiciclina	100	-	-	-	-	-	-	-	-	50-100	10-20	10-20	-	-	-

En lo que se refiere a la aplicación del Penzym a la leche de otras especies diferentes a la vaca, Althaus y col. (2001) obtuvieron límites de detección en leche de oveja, similares a los indicados por el fabricante y por otros autores para la leche de vaca, excepto para el caso de la cefoperazona (900 µg/Kg) y el ceftiofur (120 µg/Kg) para los que límites encontrados fueron más elevados.

Para el método de unión a receptores proteicos Beta Star diferentes autores concluyeron que este método permite detectar la penicilina, oxacilina, ampicilina, nafcilina, cefquinoma, cloxacilina, dicloxacilina, cefapirina, cefacetrilo, cefoperazona y cefalonio a concentraciones inferiores a los LMRs (Žirdauskienė y Šalomskienė, 2007; Reybroeck y col., 2010).

En el Delvo-X-Press, Petrovic y col. (2008) calcularon límites de detección para la penicilina G, la amoxicilina y la ampicilina inferiores a los LMRs, en cambio la cloxacilina se detectaba a una concentración superior al LMR establecido por la legislación. En otro estudio de comparación realizado por Salomskiene y col. (2009) obtuvieron los mismos LD indicados por la casa fabricante en el método Delvo-X-Press en el caso de la penicilina G, ampicilina, amoxicilina y oxacilina.

Respecto a otros métodos de unión a receptores proteicos utilizados como son el Rosa Charm, Snap y Twinsensor no se han encontrado trabajos en los que se calculen los límites de detección por lo que no ha sido posible realizar la comparación con los presentados por los fabricantes.

Aunque no se incluyen en el Cuadro 12 los métodos específicos para sustancias como la gentamicina (Snap Gentamicin: LD= 30 µg/Kg), la enrofloxacin (Rosa Enrofloxacin: LD= 8 µg/Kg), estreptomycin (Charm Estreptomycin: LD= 75 µg/Kg) y cloranfenicol (Charm Chloramphenicol: LD= 0,1 µg/Kg), los límites señalados por los laboratorios fabricantes son en todos los casos inferiores a los Límites Máximos de Residuos.

4.4.3. Sensibilidad

4.4.3.1. Generalidades

La sensibilidad es un parámetro que resulta de gran utilidad para evaluar la capacidad de un método para detectar la presencia de un determinado fármaco a un nivel equivalente a su LMR en una muestra de leche.

En ese sentido, Zeng y col. (1996) definen la sensibilidad de un método de cribado como la relación porcentual de obtener resultados positivos en un método cuando se analizan muestras de leche que contienen el fármaco a una concentración

establecida por la legislación. Otros autores la definen como la capacidad de un método para detectar muestras realmente positivas como tales (Trullols y col., 2004).

Para el cálculo de la sensibilidad, la Federación Internacional de Lechería (IDF, 1997) especifica que debe determinarse mediante la preparación de 30 disoluciones de una misma muestra de leche, todas ellas adicionadas con concentraciones equivalentes al LMR de la sustancia objeto de estudio. El cálculo se efectúa como el cociente porcentual entre el número de respuestas positivas al método, partido por el número total de determinaciones realizadas ($n=30$).

Además, las normas ISO (ISO 2003a,b) recomiendan emplear para la determinación experimental de la sensibilidad de los métodos de cribado, muestras de leche libres de antibióticos y que cumplan las mismas características descritas anteriormente (apartado 4.4.2). A las muestras que cumplan estos requisitos se les adicionará las concentraciones de antimicrobianos adecuadas para el cálculo de la sensibilidad.

4.4.3.2. Sensibilidad de los métodos microbiológicos

Con respecto a la sensibilidad de los métodos microbiológicos, Suhren y Heeschen (1994), con el fin de evaluar los resultados de los métodos Charm AIM-96, Delvotest SP y BRT AiM, concluyen que los métodos microbiológicos como el Delvotest SP y BRT AiM son apropiados para detectar oxitetraciclina y Sulfadimidina, mientras que el método Charm AIM-96 resultó muy sensible para la gentamicina.

Mc Grane y col. (1996) calcularon para el método Delvotest SP una sensibilidad al LMR del 98% para la cloxacilina, un 100% a la sulfametazina y menos de un 50% a la tetraciclina, mientras que el método Charm AIM-96 presenta una sensibilidad del 38% para la cloxacilina, 65% para la sulfametazina e inferior al 50% para la tetraciclina. Ninguno de los dos métodos presentó sensibilidad alguna para detectar residuos de cloranfenicol y estreptomina.

En el caso de antibióticos betalactámicos, Scanella y col. (1997) encontró para el Delvotest SP una sensibilidad del 100% para la penicilina, ampicilina y cloxacilina cuando se encuentran presentes en concentraciones de 3,6, 6, y 30 $\mu\text{g/L}$, respectivamente.

También Suhren (1997) evaluó el método Delvotest SP para detectar residuos de cloxacilina (0, 15, 22,5, 30 y 45 $\mu\text{g/L}$) y sulfametoxazol (0, 12,5, 25, 50, 75 y 100 $\mu\text{g/L}$) en muestras de leche liofilizadas, obteniendo para las muestras con 30 $\mu\text{g/L}$ de cloxacilina (LMR) y 100 $\mu\text{g/L}$ de sulfametoxazol (LMR) un 100% de resultados

positivas, mientras que las muestras con 15 µg/L (0,5 veces LMR) de cloxacilina y 50 µg/L (0,5 veces LMR) de sulfametoxazol presentaron un 52,9% y 98,6% de resultados positivos, respectivamente.

Se debe destacar que numerosos factores relacionados con las características propias de los métodos pueden afectar su sensibilidad. Así, la sensibilidad del método BRT AiM depende de la calidad y de la cantidad del microorganismo de prueba presente en el medio. En este sentido algunos autores, (Müller y Jones, 1993; Nagel y col., 2009, 2010) destacan que una mayor concentración de microorganismos en el medio de cultivo produce una disminución en la sensibilidad de los métodos, mientras que una disminución de esporas produce un aumento en la sensibilidad del método.

Por otro lado, el cálculo de la sensibilidad de los métodos microbiológicos en la leche de oveja ha sido abordado por Roca y col. (2007). Estos autores calcularon la sensibilidad al LMR y en algunos casos a concentraciones equivalentes a dos veces el LMR para 6 antibióticos pertenecientes al grupo de betalactámicos (penicilina G, ampicilina, cloxacilina, cefalexina, cefoperazona y ceftiofur) en los métodos microbiológicos, CMT Copan, Delvotest MCS y Eclipse 100. Con los resultados obtenidos concluyeron que la sensibilidad de los métodos Delvotest MCS y Eclipse 100 fue elevada para casi todos los antibióticos betalactámicos ensayados a excepción de la cloxacilina y el ceftiofur (necesitaron ser ensayados al doble de su LMR), y que la adición de azidiol, así como el calentamiento de las muestras de leche previo al análisis no afectó a la sensibilidad de ninguno de los métodos debido a la prolongación del tiempo de incubación recomendado en caso de usar conservante por los fabricantes.

Además, existen otros factores inherentes al uso del método que también pueden afectar a su respuesta como la modificación del tiempo de incubación, el periodo de almacenamiento de los métodos o el volumen de la muestra. Así, por ejemplo, Luitz y Suhren (1995a, b) y Reybroeck (1995a, b) señalan que la prolongación en el tiempo de incubación del método Delvotest SP produce una disminución en la sensibilidad de algunos antimicrobianos presentes en la leche.

El período de almacenamiento de los métodos también puede afectar a su respuesta. En el método BRT AiM los límites de detección para la penicilina disminuyeron y para la oxitetraciclina aumentaron empleando placas almacenadas a 6 °C durante 20 semanas (Luitz y Suhren, 1995).

4.4.3.3. Sensibilidad de los métodos específicos

La sensibilidad de los métodos específicos también ha sido estudiada por diversos autores. En este sentido, Moretain y Froger (1998) analizaron por el método enzimático Penzym muestras de leche con diferentes concentraciones de penicilina, cefalexina, oxitetraciclina, DH-estreptomicina y eritromicina. En dicho trabajo, se concluye que el 98,7% de las muestras con concentraciones de penicilinas y cefalexina superiores a las recomendadas por la casa fabricante fueron positivas y el 97% de las muestras que tenían oxitetraciclina, DH-estreptomicina y eritromicina presentaron resultados negativos al método, lo cual es lógico ya que se trata de un método específico para los antibióticos betalactámicos.

Para el método de unión a receptores Snap, Suhren y Reichmuth (1998) realizaron un estudio para determinar su sensibilidad a diferentes sustancias. Los resultados obtenidos indican que en 7 de los 11 betalactámicos ensayados, las sensibilidades calculadas estaban por debajo de los LMRs, mientras que en dos de ellas (oxacilina y cefquinoma) estaban justo por encima, y la amoxicilina y la nafcilina se detectaron a concentraciones equivalentes a 1,5 y 2,7 veces sus LMRs, respectivamente.

Reybroeck y col. (2010) para validar el método Beta Star estudian, entre otros parámetros, la sensibilidad de este método indicando que este método es capaz de detectar todos los betalactámicos al Límite Máximo de Residuos, excepto la cefalexina (capacidad de detección = 6000 µg/kg; LMR = 100 µg/Kg) y penetamato (capacidad de detección = 80 µg/kg; LMR = 4 µg/Kg) y el ceftiofur sólo se detectan a partir de 500 µg/Kg (LMR = 100 µg/Kg).

En muestras de leche de oveja en un estudio realizado por Berruga y col. (2009) señalan que la sensibilidad para la ampicilina, cloxacilina, penicilina G, cefoperazona, cefalexina y ceftiofur al LMR, en los métodos Rosa Charm BL, Snap BL y Twinsensor, fue variable según el método, presentando los mejores resultados el Twinsensor para todos los antibióticos ensayados.

Los citados autores también realizaron el estudio con los métodos de unión a receptores proteicos específicos a tetraciclinas Rosa Charm TET, Snap TET y Twinsensor, mostrando en este caso también que el método Twinsensor presentó la mayor sensibilidad para la clortetraciclina, oxitetraciclina y la tetraciclina. En cambio, los métodos Rosa Charm y Snap son muy adecuados para la detección al LMR de la oxitetraciclina y la tetraciclina mientras que la sensibilidad para la clortetraciclina presenta valores menores (60 %).

4.4.4. Selectividad

4.4.4.1. Generalidades

La selectividad está asociada a la presencia de resultados conocidos como “falsos positivos” y resulta de gran interés para la evaluar la capacidad analítica de un método.

Para el cálculo de la selectividad se deben analizar un elevado número de muestras de leche que tienen que cumplir una serie de condiciones en especial que procedan de animales no tratados con medicamentos (ISO 2003a, b). Según Sischo y Burns (1993), la selectividad se calcula como la frecuencia relativa porcentual entre los resultados negativos obtenidos, partido por el número total de muestras analizadas.

Además, otros autores definen la selectividad como la capacidad de un método para detectar muestras negativas que realmente son negativas (Trullols y col., 2004). En este sentido, un buen método de cribado debe presentar elevados valores de selectividad, es decir, un bajo porcentaje de resultados “falsos positivos”.

4.4.4.2. Selectividad de los métodos microbiológicos

Existen muchos estudios que señalan que los métodos microbiológicos pueden verse afectados por la presencia de sustancias inhibidoras que se encuentran de forma natural en la leche como son la lactoferrina, lisozima, lactoperoxidasa, células somáticas, ácidos grasos de cadena larga, etc. (Carlsson, 1991; Cullor, 1992; Müller y Jones, 1993; Mäyra-Mäkinen, 1993; Zorraquino, 1996; Barbosa, 1997; Oliver y col., 1984). En consecuencia, la presencia de estos inhibidores naturales en la leche puede ser la causa de la aparición de resultados positivos (“falsos positivos”).

Carlsson y Björck (1989) señalan que altas concentraciones de lactoferrina o lisozima de forma separada no producen resultados positivos, mientras que si la concentración de estos inhibidores son elevadas, lo que ocurre en el caso de leches mamáticas o calostrales, pueden aparecer resultados no conformes. Sin embargo la incidencia de “falsos positivos” encontrados por estos autores en el método Delvotest en leche de animales sanos fue muy baja con porcentajes inferiores al 0,02%.

En muestras de leche de otras especies diferentes a la vaca, Althaus y col. (2003) indican un porcentaje de resultados “falsos positivos” de 3,75% en muestras de leche de oveja para el método BRT AiM y del 4,5% para el métodos Delvotest que puede ser debido a características propias de la leche de esta especie (composición, inhibidores naturales, etc.).

Algunos de estos efectos pueden ser evitados o minimizados mediante el empleo de procedimientos como el calentamiento previo de las muestras de leche. Schlegelova y Rysanek (2000) señalan que el tratamiento térmico previo (85 °C-5 minutos) de las muestras de leche disminuye los resultados “falsos positivos” del método Delvotest hasta en un 18,2% por lo que recomiendan el calentamiento antes del análisis.

De forma análoga, Kang y Kondo (2001) indican y sugieren prolongar la lectura de 2 h 30 min a 2 h 45 min y 3 h para reducir la incidencia de estos resultados en el caso del método Delvotest.

También, Molina y col. (2003a) señalan que los resultados “falsos positivos” de los métodos BRT AiM y Delvotest pueden disminuir en muestras de leche de oveja al calentarlas durante 10 minutos a 82 °C, ya que sin tratamiento térmico la selectividad fue del 96,3% en el BRT y del 97,7% en el Delvotest y esas mismas muestras calentadas presentaron porcentajes de selectividad muy elevados (99 y 98,7%, respectivamente).

En este sentido, Zaadhof y col. (2004) en un estudio sobre la viabilidad de la aplicación de métodos microbiológicos de cribado a la leche de oveja y cabra, consiguieron reducir el porcentaje de resultados “falsos positivos” en un 2% prolongando el tiempo de incubación durante 30 minutos más, en muestras de leche de ambas especies analizadas con el método BRT-AS-Special.

Por otro lado, el tiempo de incubación es otro factor que puede influir en la aparición de resultados “falsos positivos”, Molina y col. (1999) en el método BRT AiM observaron una disminución en la frecuencia de casos positivos cuando el tiempo de incubación del método se prolongó desde 3 a 4 horas, en muestras de leche de cabra conservadas con azidiol.

También, la selectividad de un método puede verse afectada por sustancias o agentes que se incorporan a los métodos microbiológicos con el objetivo de mejorar la sensibilidad de estos a algunos antibióticos, como por ejemplo, la adición de cloranfenicol para mejorar la detección a antibióticos pertenecientes al grupo de las tetraciclinas (Nagel y col., 2009) o trimetropin para el caso de las sulfamidas (Nagel y col., 2010).

El uso de conservantes en las muestras de leche puede aumentar la presencia de resultados positivos y por tanto, modificar la selectividad de los métodos (Molina y col., 2003a; Montero y col., 2005; Roca y col., 2007). La influencia del conservante sobre la respuesta de los métodos se detallara más adelante en el apartado 4.5. de la

introducción que trata sobre la influencia de los factores relacionados con la toma de muestras.

4.4.4.3. Selectividad de los métodos específicos

En cuanto a los métodos específicos también se han encontrado estudios que evalúan esta propiedad, que indica la presencia de resultados conocidos como “falsos positivos” o “falsos no conformes”, así como los factores que pueden influir en los resultados, aunque el número de trabajos experimentales es mucho menor debido a que los métodos de unión a receptores proteicos son más recientes que los microbiológicos.

Para el método enzimático Penzym, Seymour y col. (1988) determinaron un 17% de resultados positivos (“falsos positivos”) en muestras de leche. Por el contrario, Andrew y col. (1997) señalan en muestras de leche de vacas individuales aproximadamente un 9,9% de casos “falsos positivos” lo que equivale a una selectividad del 90,1%.

Por el contrario, Contreras y col. (1997) al utilizar este mismo método en muestras de leche de cabra encontraron, de las 935 muestras analizadas solamente un resultado positivo. Del mismo modo, Zeng y col. (1996) obtuvieron un 100% de selectividad al analizar 20 muestras de leche de cabra.

En el caso de la leche de oveja, Molina y col. (2002) señalan una selectividad en el método Penzym 100 del 82,8%. Estos autores indican un valor más elevado al utilizar conservante en las muestras de leche de oveja (84,7%). También recomiendan incrementar el segundo tiempo de incubación a 22 minutos de los 7 minutos recomendados por el fabricante en muestras de leche de esta especie, ya que de esta forma se mejora el porcentaje de selectividad del método, tanto en muestras sin conservante (97,1%) como con aquellas con conservante (99,6%)

En los métodos de unión a receptores proteicos, el efecto de la presencia de inhibidores naturales en la leche sobre la selectividad ha sido estudiado por diferentes autores. Angelidis y col. (1999) observaron en el método Delvo-X-Press resultados positivos debido a la presencia de lactoferrina o plasma bovino a concentraciones no fisiológicas. La selectividad de este método fue del 94% para leche de animales sanos mientras que para animales mamíticos resultó del 88%. Además observaron una moderada pero significativa correlación lineal positiva entre los resultados positivos y el nivel de células somáticas. Sin embargo, Mitchell y col., 1998 han señalado que no encontraron resultados “falsos positivos” al emplear este método en muestras de leche de tanque.

En el caso del método Snap, Maron-Carraro y col. (2000) determinaron que un recuento de células somáticas elevado junto a un pH demasiado alto o bajo, puede ser la causa de la aparición de resultados positivos.

Reybroeck y col. (2010) en un estudio sobre validación del método Beta Star obtiene un 100% de selectividad al analizar muestras de leche de distintos tipos de leche de vaca: UHT, esterilizada, reconstituida en polvo, descongelada y también leche de cabra y oveja.

Al analizar muestras de leche de oveja con los métodos de unión a receptores proteicos específico a antibióticos betalactámicos y/o tetraciclinas (Rosa Charm, Twinsensor, Snap) Berruga y col. (2009) obtienen selectividades elevadas para los métodos de unión a receptores proteicos específicos a betalactámicos: Twinsensor BL del 95% y Snap BL 99%, siendo menor para Rosa Charm BL (90%) lo que indica la necesidad de modificar el procedimiento de análisis para muestras de leche de esta especie. En los métodos específicos a tetraciclinas la selectividad en muestras de leche de oveja también resultaron elevadas: Snap TET 96% y Twinsensor TET 97% y Rosa Charm TET del 99%.

En el caso de la leche de cabra, Contreras y col. (1997) obtienen un 100% de selectividad en el método Snap al analizar 935 muestras de leche. También, Zeng y col. (1998) obtienen para el método Snap específico a betalactámicos una alta selectividad superior al >90%.

Teniendo en cuenta toda la información existente en cuanto a las características de funcionamiento de los métodos de cribado, se puede concluir que estos deben presentar una buena sensibilidad y selectividad, es decir, bajos valores de “falsos negativos” y “falsos positivos”. Además sus límites de detección deben ser similares a los LMRs, todo ello con el objetivo de evitar penalizaciones a los ganaderos en muestras de leche que cumplan la legislación y la llegada de productos con residuos de antibióticos a los consumidores.

4.5. Influencia de factores relacionados con la toma de muestras sobre la respuesta de los métodos de detección de antibióticos en la leche

4.5.1. Influencia del conservante en las muestras de leche

En la situación actual de recogida de las muestras de leche en España el uso de conservantes en las muestras de leche es una práctica habitual, ya que éstos retrasan el deterioro de las mismas contribuyendo a mantener sus propiedades físico-químicas hasta la llegada a los laboratorios de control.

La utilización de conservantes puede ocasionar interferencias con los métodos de detección de antibióticos, especialmente con los de tipo microbiológico, ya que dependiendo de su composición pueden retrasar o inhibir el crecimiento microbiano, base analítica de estos métodos.

Según Müller y Jones (1993) la sobredosificación de ácido bórico como conservante o incluso su empleo a niveles normales (Schiffmann y col., 1992) puede provocar fallos en la reducción del color de los indicadores de los métodos microbiológicos dando resultados dudosos o positivos.

Zorraquino (1997) en un estudio sobre la influencia del efecto de la adición de azidol como conservante en las muestras de leche de vaca, sobre las lecturas fotométricas del método BRT a diferentes tiempos de incubación (2 h 30 min.; 3 h 15 min. y 3 h 30 min.) para concentraciones crecientes de distintos antimicrobianos, obtienen lecturas de absorbancia más elevadas con la presencia de azidol en las muestras de leche respecto aquellas muestras sin conservante y que, en todos los casos, las lecturas fueron superiores en los tiempos más bajos de incubación (2 h 30 min.), y menores al aumentar el tiempo de incubación.

Por otro lado, Molina y col. (2003a) también estudiaron el efecto de uso de dos conservantes, dicromato potásico y azidol, sobre la respuesta de los métodos BRT AiM y Delvotest. Estos autores dedujeron que el dicromato potásico inhibía totalmente el crecimiento *G. stearothermophilus* mientras que con la presencia de azidol en muestras de leche oveja la selectividad de los métodos resultó del 90,2% para el BRT y 91,0% Delvotest, menores que en las muestras sin conservante (96,3%: BRT y 97,7%: Delvotest). Al calentar (82 °C/10 min.) estas mismas muestras de leche con azidol aumenta la selectividad (94,8%: BRT y 95,3%: Delvotest).

Montero y col. (2005) también estudiaron el efecto del uso de azidol como conservante en las muestras de leche de oveja sobre la respuesta del método Eclipse "100 ov", obteniendo una elevada incidencia de resultados dudosos en las muestras que contenían conservante (8,6%) en comparación con las muestras sin conservante (0,6%).

Algunos autores recomiendan alargar el tiempo de incubación de los métodos microbiológicos en muestras de leche que contengan azidol para disminuir los resultados "falsos positivos". Así, Molina y col. (1999) recomiendan prolongar, en el caso de analizar muestras de leche con azidol, la incubación del método BRT de 3.00 hasta 3.30 o 4.00 horas ya se obtiene una disminución en el porcentaje de muestras positivas.

Del mismo modo, en un informe técnico realizado por ZEU-Inmunotec (2008) sobre el método Eclipse 100 recomiendan aumentar el tiempo de viraje del método (entre 10-15 minutos) al analizar muestras de leche con azidol debido a las propiedades inhibitorias del propio conservante, pero teniendo en cuenta que la sensibilidad para algunos antibióticos se puede ver ligeramente aumentada.

Roca y col. (2007) al prolongar el tiempo de incubación, 15 minutos más del tiempo recomendado por el fabricante, obtienen para los métodos CMT Copan, Delvotest MCS y Eclipse 100 en muestras de leche de oveja una selectividad y sensibilidad más elevada.

4.5.2. Influencia de la refrigeración de las muestras de leche

Según el Real Decreto 1728/2007 la leche almacenada en la granja debe mantenerse refrigerada a una temperatura a 6 °C si la recogida es cada dos días, o hasta 8 °C si la recogida es diaria. A la llegada al centro lácteo la temperatura de la leche debe encontrarse entre 0 y 10 °C.

También las muestras de leche obtenidas en granjas y cisternas para determinar la calidad físico-química de la leche, se envían a los laboratorios de control en condiciones de refrigeración, donde pueden ser analizadas en el momento de su recepción o permanecer almacenadas en frío horas e incluso días antes de su análisis.

Las condiciones de refrigeración de las muestras durante el transporte y su conservación en el laboratorio, pueden producir una degradación, inactivación o pérdida de actividad antimicrobiana sobre algunas moléculas presentes en la leche, como es el caso de los antibióticos.

En el caso concreto de la leche la información existente sobre la influencia de las condiciones y el tiempo de almacenamiento en refrigeración sobre la estabilidad y degradación de sustancias antimicrobianas es muy limitada y se refiere solamente a algunos antibióticos. Además los estudios realizados se centran sobre todo en el análisis de la degradación de los antibióticos empleando técnicas cromatográficas.

Así, Wiese y Martín (1989) obtuvieron un residuo constante de penicilina G en muestras de leche fortificadas a 20 y 100 µg/kg, cuando las muestras se almacenaron durante más de 6 días a 4 °C. De un modo similar, muestras con 20 µg/kg de ampicilina almacenadas a 4 y -70 °C, no presentaron pérdidas significativas del analito aún después de los 6 días de almacenamiento.

Por el contrario, Haagsma (1993), demostró que aproximadamente el 60% de penicilina G en la leche se destruye dentro de las 48 h a 2 °C. También Guay y col. (1987) señalan pérdidas hasta del 75% en este antibiótico cuando la temperatura de conservación empleada fue de 22 °C.

Por otro lado, Schenck y col. (2000) estudiaron el almacenamiento a 4 °C y -70 °C, sobre la estabilidad de la ampicilina en la leche mediante una técnica LC-FL. Estos autores no obtuvieron ninguna pérdida significativa en su concentración bajo ninguna de las dos condiciones de almacenamiento durante 6 días.

En cambio, para otros antibióticos pertenecientes a la familia de los betalactámicos (amoxicilina, cloxacilina, oxacilina y penicilina G) Riediker y col. (2004) obtienen una degradación mediante LC-ESI-MS/MS para los 4 analitos en refrigeración superior al 50% tras 7 días de conservación, y una degradación total a los 28 días.

Del mismo modo Roca y col. (2009), en un estudio de la influencia de las condiciones de almacenamiento sobre la estabilidad de las penicilinas en la leche, empleando HPLC para la cuantificación de las pérdidas, indicaron que la penicilinas son moléculas que presentan porcentajes de degradación elevados (30-43%) cuando las muestras de leche son refrigeradas a 4 °C durante una semana.

En el caso de estudios realizados con tetraciclinas, autores como Podhorniak y col. (1999) evaluaron su estabilidad en la leche bajo condiciones de almacenamiento. Para ello, fortificaron las muestras de leche con 50 µg/kg de diferentes tetraciclinas y las analizaron por HPLC después de ser mantenidas a 4 y 25 °C durante 24, 48 y 72 horas. No observaron pérdidas de actividad de las tetraciclinas en las muestras conservadas a 4 °C durante 48 horas o a 25 °C durante 24 horas, sin embargo, las pérdidas se encontraron después de 72 horas a 4 °C y 48 horas a 25 °C, respectivamente.

También Samanidou y col. (2007) en un estudio sobre la validación de un método de confirmación HPLC para la determinación de 7 tetraciclinas en leche de acuerdo a la Decisión 2002/657/CEE, evaluaron la estabilidad de los antibióticos en los extractos obtenidos y refrigerados a 4 °C en oscuridad, concluyendo que bajo estas condiciones, solo fueron estables durante la primera semana de almacenamiento.

En cuanto a la leche de oveja, Spisso y col. (2007), evaluaron la estabilidad de la clortetraciclina, oxitetraciclina y tetraciclina mediante un método LC-FL. Las muestras de leche se almacenaron a -20 y -70 °C y se analizaron los días 0, 6, 12, 24

y 30, los resultados obtenidos no mostraron en ningún caso pérdidas en la concentración de los analitos estudiados.

Por el contrario, Himanish y col. (2008) en un estudio sobre la estabilidad de la oxitetraciclina en la leche obtienen pérdidas del 6-18% entre las 24 y 96 horas de refrigeración e inferiores al 5% en congelación.

A su vez, Roca y col. (2008) también obtuvieron diferentes porcentajes de degradación (20-32%) en muestras de leche adicionadas con tetraciclinas (clortetraciclina, doxicilina, oxitetraciclina y tetraciclina) al LMR que fueron refrigeradas a 4 °C durante una semana.

Los estudios sobre el efecto de la refrigeración de las muestras de leche sobre los métodos cualitativos de detección de residuos de antibióticos son muy reducidos. Así Foissy y col. (2005) estudiaron la influencia de la conservación de muestras de leche cruda en refrigeración y congelación sobre la reproducibilidad de resultados en el test BRT. Los resultados obtenidos mostraron que desde el primer día de refrigeración, los resultados no eran reproducibles, mientras que en congelación, los resultados se mantienen durante una semana, a partir del cual los resultados positivos descendieron un 50%.

Roca y col. (2007) analizaron el efecto de la conservación (4-6 °C) de las muestras de leche de oveja con antibióticos betalactámicos a concentraciones equivalentes al LMR sobre los métodos microbiológicos CMT Copan, Delvotest MCS y Eclipse 100, obtuvieron degradaciones más rápidas para la penicilina, ampicilina y cloxacilina a diferencia de la cefalexina, cefoperazona y ceftiofur que presentan una mayor estabilidad durante la refrigeración.

Los escasos trabajos realizados sobre la influencia de los factores relacionados con la toma de muestras sobre los métodos de detección de antibióticos empleados en los laboratorios de control, y debido a las condiciones actuales de la toma de muestras en España (uso de conservante, refrigeración de las muestras de leche...) hacen que sea necesaria la evaluación de estos factores, para establecer un adecuado protocolo de análisis.

OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

Dado que la presencia de residuos de antibióticos en la leche puede tener efectos adversos sobre la salud humana e influir negativamente en la fabricación de algunos productos lácteos resulta totalmente necesario establecer un sistema de control de estas sustancias para evitar su llegada a la industria y al consumidor.

En España concretamente se ha regulado el control de los residuos de antibióticos en la leche dentro del sistema de gestión de la trazabilidad y la calidad de la leche cruda de vaca mediante el Real Decreto 217/2004 y 1728/2007 que establecen, entre otros aspectos, la normativa referente a la toma de muestras y las pruebas de detección de residuos de antimicrobianos en la leche.

Dentro de la primera fase del control de residuos de antibióticos se utilizan, en especial, métodos de cribado cuya finalidad es determinar la presencia o ausencia de residuos por encima de los Límites Máximo de Residuos (LMRs) establecidos por la legislación. Estos métodos de cribado representan una herramienta muy importante para el control de los residuos. Aunque, son muchos los métodos existentes a nivel comercial y las características de funcionamiento varían entre ellos. Además los resultados de estos métodos pueden verse afectados por diversos factores relacionados con la toma de muestras de leche como el almacenamiento en refrigeración y el uso de conservante.

Por todo ello, el objetivo general del presente trabajo ha sido evaluar los principales métodos de cribado comercializados en España para establecer el protocolo de análisis más adecuado para la detección de residuos antimicrobianos en la leche. Para llevar a cabo este propósito, se han planteado tres estudios con objetivos específicos en cada uno de ellos, que se detallan a continuación:

1. PRIMER ESTUDIO: Evaluación de los métodos de detección de residuos de antimicrobianos en la leche de vaca

Con este primer estudio se ha pretendido evaluar las características de los métodos empleados en la detección de residuos de antimicrobianos en la leche cruda de vaca y de este modo establecer su idoneidad para su empleo en los mecanismos de control. Para cumplir con este objetivo se ha estudiado la selectividad de los métodos microbiológicos y específicos, y también se ha establecido la sensibilidad de estos métodos para la detección de las sustancias antimicrobianas más empleadas en el ganado vacuno lechero.

2. SEGUNDO ESTUDIO: Estrategia analítica para la detección de residuos de antimicrobianos en la leche de vaca

Teniendo en cuenta los parámetros calculados en el primer estudio para la selectividad y la sensibilidad de los métodos de detección de residuos de antibióticos en la leche, así como las frecuencias de uso de las sustancias antimicrobianas más empleadas en el tratamiento de la mastitis y otras patologías de carácter infeccioso del ganado vacuno lechero, el objetivo de este estudio ha sido establecer la estrategia analítica más adecuada, combinando diferentes métodos de cribado que permita una mayor cobertura en la detección de antimicrobianos en la leche.

3. TERCER ESTUDIO: Influencia de los factores relacionados con la toma muestras sobre la respuesta de los microbiológicos de detección de antibióticos en la leche de vaca

Este tercer estudio ha tenido como objetivo evaluar el efecto de los factores relacionados con la toma de muestras de la leche, uso de conservante y refrigeración, sobre la respuesta de algunos de los métodos microbiológicos de cribado más utilizados en los laboratorios de control en España. Los antibióticos ensayados han sido la amoxicilina, ampicilina y oxitetraciclina, dado que el RD 1728/2007 establece que los métodos empleados en la prueba de detección de antibióticos tienen que ser capaces de detectar al menos estos antibióticos a niveles del Límite Máximo de Residuos (LMR), y la penicilina G dada su frecuencia de utilización en ganado vacuno lechero.

En el estudio se ha evaluado el efecto del tiempo de refrigeración en muestras de leche sin conservante y con azidol sobre la pérdida de actividad antimicrobiana de los antibióticos señalados anteriormente, mediante métodos microbiológicos de cribado (BRT AiM, Delvotest MCS Accelerator y Eclipse 100).

Con todo ello se pretende establecer una adecuada estrategia y mejorar los protocolos de análisis para la detección de residuos de medicamentos en la leche, para cumplir con los mecanismos de control establecidos y, de este modo, evitar la llegada a la industria y a los consumidores de leche con residuos de antibióticos.

MATERIAL Y MÉTODOS

III. MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se planteó en base a la realización de los tres estudios que se describen a continuación:

1. PRIMER ESTUDIO: Evaluación de los métodos de detección de residuos de antimicrobianos en la leche de vaca

1.1. Diseño experimental

Dado que el primer estudio pretende evaluar la idoneidad de los principales métodos de detección de residuos de antimicrobianos utilizados en España, el trabajo se ha planteado en base a dos experimentos: determinación de la selectividad (“falsos positivos”) de cada uno de los métodos microbiológicos, enzimático y de unión a receptores proteicos y un segundo experimento para establecer la sensibilidad de estos métodos para la detección de los antimicrobianos más empleados actualmente en vacuno lechero de acuerdo a los Límites Máximos de Residuos (LMRs).

1.2. Muestras de leche

Las muestras de leche de vaca empleadas en este estudio fueron suministradas por la granja de vacuno lechero “SAT MORE” ubicada en el término municipal de Bétera (Valencia) y por el Centro de Apoyo Tecnológico Lácteo “CEATEL” (Pinedo, Valencia).

Las muestras de leche se recogieron de animales sanos y no tratados con ningún medicamento entre el segundo y el octavo mes de lactación con una frecuencia semanal. Los análisis de composición se realizaron en el Laboratorio Interprofesional Lechero de la Comunidad Valenciana (LICOVAL) para la determinación del contenido en grasa, proteína, recuento de gérmenes totales y de células somáticas, garantizando que cumplieran con los requisitos de composición y calidad señalados en la norma UNE-EN ISO 13969 (2003a) para los métodos microbiológicos y en la norma UNE-EN ISO 18330 (2003b) para los métodos específicos.

Las muestras de leche utilizadas en este estudio contenían entre 3 y 4,5 % de grasa, un porcentaje de proteína entre 3 y 3,75 %, el recuento de células somáticas entre 14.000 y 149.000 células/ml y los gérmenes totales entre 9.000 y 100.000 ufc/ml.

Para el estudio de la selectividad se analizaron un total de 100 muestras procedentes de animales individuales, cada muestra de leche se analizó por triplicado el mismo día de su recogida mediante los métodos microbiológicos, enzimático y de unión a receptores proteicos seleccionados. Los resultados fueron interpretados por

tres personas entrenadas, considerando un resultado como negativo, dudoso o positivo cuando al menos dos coincidían con el resultado.

A su vez para el estudio de la sensibilidad (Figura 14), las muestras de leche analizadas procedieron de la leche de mezcla, de 30 muestras individuales y se analizaron para cada antibiótico 3 concentraciones diferentes (0,5 LMR, LMR y 2 LMR), aunque en algunos casos debido a los límites de detección de los métodos se prepararon concentraciones diferentes (LMR, 2 LMR y 4 LMR o 0,25 LMR, 0,5 LMR y LMR).

El número de determinaciones de cada muestra de leche adicionada con un antibiótico a una concentración determinada (C_1 , C_2 y C_3) fue de 30 repeticiones en el caso de los métodos microbiológicos, mientras que para los métodos enzimáticos y de unión a receptores proteicos, se analizaron únicamente 10 repeticiones siguiendo la norma UNE-EN ISO 18830 (2003b) establecida para estos métodos.

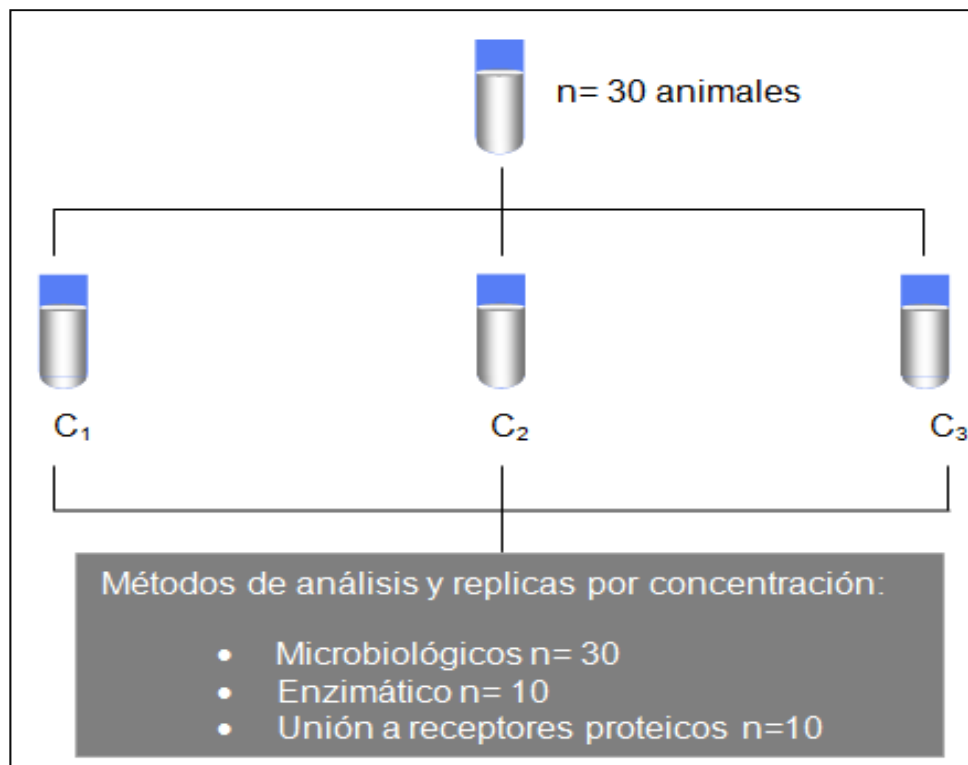


Figura 14. Diseño experimental del estudio de sensibilidad de los métodos de detección de residuos de antimicrobianos en la leche

1.3. Sustancias antimicrobianas

En cuanto a las sustancias antimicrobianas empleadas en el estudio, éstas se seleccionaron en función de las frecuencias de riesgo de aparición calculadas por Zorraquino y col. (2007) en el tratamiento de la mamitis y Zorraquino (2008) en el caso

de otras patologías infecciosas “no mamíticas”. En el Cuadro 14 se presentan las sustancias ensayadas junto a sus respectivos LMRs (Límites Máximos de Residuos) establecidos por la normativa vigente (RD 37/2010), además se indica el disolvente utilizado y la referencia comercial del producto empleado.

Cuadro 14. Características de las sustancias antimicrobianas empleadas en el estudio sobre la sensibilidad de los métodos de cribado

Sustancias antimicrobianas	LMR (µg/Kg)	Disolvente	Referencia comercial
Betalactámicos			
Amoxicilina	4	H ₂ O	Sigma A-8523
Ampicilina	4	H ₂ O	Sigma A-9518
Cloxacilina	30	H ₂ O	Sigma C-9393
Dicloxacilina	30	H ₂ O	Sigma D-9016
Penicilina G	4	H ₂ O	Sigma Pen-Na
Cefoperazone	50	H ₂ O	Sigma C-4292
Cefalexina	100	H ₂ O	Sigma C-4895
Cefquinoma	20	Acetonitrilo	Shering-Plough
Ceftiofur	100	H ₂ O	Vetranal 34001
Cefalonium	10	Acetonitrilo	Vetranal 32904
Tetraciclinas			
Oxitetraciclina	100	HCl 0,1 N	Sigma O-5750
Aminoglucósidos			
DH Estreptomina	200	H ₂ O	Sigma S-6501
Gentamicina	100	H ₂ O	Sigma G-3632
Kanamicina	150	H ₂ O	Sigma K-4000
Neomicina	1500	Buffer fosfato pH	Sigma N-1876
Macrólidos			
Eritromicina	40	Metanol	Sigma E-6376
Lincomicina	150	Metanol	Sigma L-6004
Tilosina	50	H ₂ O	T6271
Quinolonas			
Enrofloxacina	100	NaOH 0,1 N	Vetranal 33699
Otros			
Colistina	50	Metanol	Sigma C-4461

Para la preparación de las disoluciones se pesó en una balanza 0,1 g de cada sustancia, corrigiendo el peso en función de la pureza, y en el caso de estar asociada a una sal por el peso molecular de ésta. Posteriormente, se disolvieron en un matraz de 100 ml usando el disolvente más adecuado para cada sustancia (Cuadro 14), obteniéndose así la solución madre de cada antibiótico con una concentración de 100 mg/100 ml. Partiendo de dicha disolución se prepararon soluciones intermedias para cada concentración ensayada.

Las muestras de leche adicionadas con cada uno de los antimicrobianos estudiados se prepararon siguiendo las recomendaciones de la Federación Internacional de Lechería (IDF, 1991), de modo que el volumen de disolución de un analito determinado no superase al 1% del volumen de solución final de leche resultante.

1.4. Métodos analíticos

1.4.1. Métodos microbiológicos

La mayoría de los métodos microbiológicos que se utilizan actualmente, y concretamente los seleccionados para este estudio, utilizan el principio de difusión en agar y contienen esporas de *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* como microorganismo de prueba.

Sin embargo, los distintos métodos difieren entre sí, en la utilización de indicadores, bien de ácido-base o de oxidación-reducción, en el formato de presentación y en los tiempos de incubación empleados en cada caso.

En todos los análisis, resulta necesario añadir un control negativo de leche para establecer el tiempo final de incubación y un control positivo con penicilina G a una concentración diferente según el método utilizado. Las características de los métodos microbiológicos y el procedimiento empleado para la realización de cada uno de ellos, recomendado por el fabricante, se describen a continuación.

1.4.1.1. Brilliant Black Reduction Test MRL (BRT MRL)

El método BRT AiM (AiM Analytik in Milch Produktions-und Vertriebs-GmbH, Munich, Alemania) empleado en este estudio corresponde a la versión MRL y se presenta en microplacas de 96 pocillos. Este método utiliza el negro brillante como indicador de oxidación-reducción (redox).

Para realizar el análisis se coloca un volumen de leche de 100 μL en cada pocillo, se sella con una lámina adhesiva transparente y se incuba en baño de agua a 64 ± 1 $^{\circ}\text{C}$ durante 3 horas aproximadamente (Figura 15).

Después de la incubación se realiza una interpretación visual de los resultados considerando la muestra de leche negativa si el color azul del pocillo ha cambiado a color amarillo y positiva si no se ha producido un cambio de color.

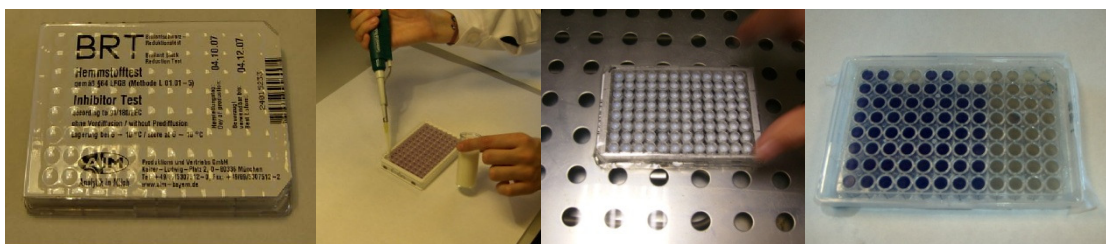


Figura 15. Procedimiento analítico del método microbiológico BRT AiM

1.4.1.2. Blue Yellow

El Blue Yellow (Charm Sciences Inc., Massachussets, USA) se presenta en formato microplaca de 96 pocillos y utiliza el púrpura de bromocresol como indicador.

En la Figura 16 se muestra de forma esquemática el procedimiento empleado para la realización de este método. En este caso se colocan 50 μL de muestra en cada pocillo y a continuación se incuba la placa a 65 $^{\circ}\text{C}$ durante 2 horas 45 minutos en estufa tras su sellado. Los resultados obtenidos se evalúan visualmente de la siguiente forma:

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



Figura 16. Procedimiento analítico del método microbiológico Blue Yellow

1.4.1.3. Delvotest SP-NT

El Delvotest SP-NT (DSM Food Specialties, Delf, Holanda) empleado en este trabajo se presenta en formato de ampollas y cada una de ellas contiene púrpura de bromocresol como indicador.

Para la realización del análisis (Figura 17) hay que colocar 100 μ L de muestra de leche en cada ampolla y se incuba en un equipo calefactor (DELVO Incubator, DSM Food Specialties) con capacidad para 10 ampollas, durante 3 horas a 64 $^{\circ}$ C. Los resultados se interpretan también visualmente observando la coloración de la cara inferior de la ampolla, calificando los resultados según la escala de colores proporcionada por el fabricante:

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

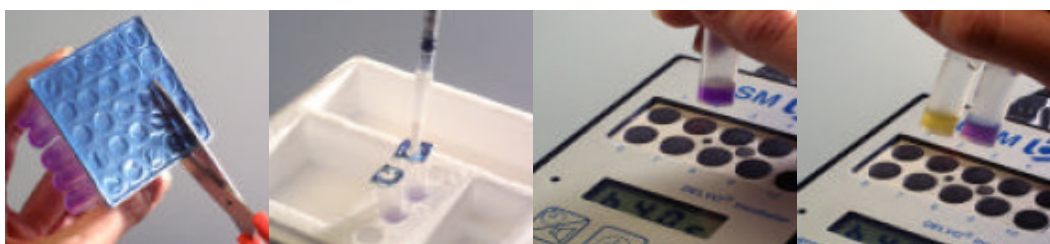


Figura 17. Procedimiento analítico del método microbiológico Delvotest SP-NT

1.4.1.4. Delvotest MCS Accelerator

El Delvotest MCS Accelerator (DSM Food Specialties, Delf, Holanda) se presenta en microplaca de 96 pocillos y como todas las versiones del método Delvotest contiene púrpura de bromocresol como indicador.

Para la realización de la prueba se emplean 100 μ L de muestra por pocillo y se incuba en el escáner-incubador proporcionado por el fabricante (Delvo Scan, DSM Food Specialties) con capacidad para 4 placas individuales, donde cada una se incuba de forma independiente. La temperatura de incubación es de 64 $^{\circ}$ C y el tiempo necesario para obtener resultados fiables es de, aproximadamente, 100 minutos.

El sistema Delvo Scan consiste en un escáner-incubador conectado a un ordenador con un software específico (versión 1.1.7.). Además, dispone de un lector de código de barras que se utiliza para identificar las placas mediante la etiqueta que

lleva cada una en el lateral derecho, y así controlar la trazabilidad del análisis. El sistema Delvo Scan incuba, analiza las placas y envía los resultados directamente a una base de datos.

En este método la interpretación de los resultados se realiza automáticamente por el escáner del equipo que realiza lecturas del cambio de color de los pocillos cada minuto y establece un valor de punto de corte ("cut-off") a partir del cual interpreta los resultados como negativos o positivos.

En la Figura 18 se muestra el procedimiento empleado para la realización del método Delvotest MCS Accelerator.

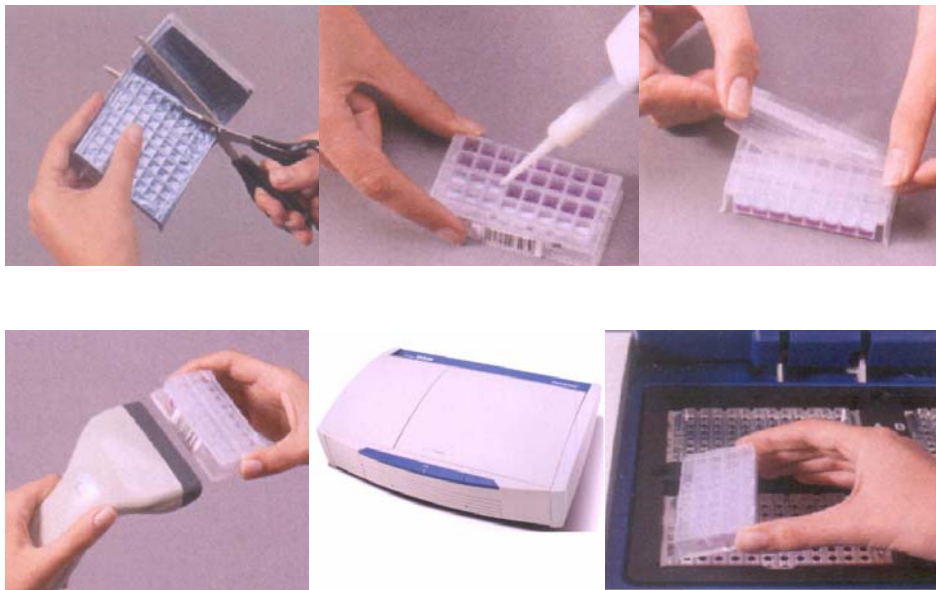


Figura 18. Procedimiento analítico del método microbiológico Delvotest MCS Accelerator

1.4.1.5. Eclipse 100

El método Eclipse 100 (Zeu-Inmunotec, Zaragoza, España) presenta un formato de microplaca de 96 pocillos y utiliza como indicador el púrpura de bromocresol.

También en este caso, tal y como se muestra en la Figura 19, se colocan 100 μL de muestra de leche en cada pocillo, posteriormente la placa se sella con una lámina adhesiva realizando una preincubación a temperatura ambiente durante una hora, y después se lava la placa tres veces con agua destilada antes de incubarla en baño de agua a 65 ± 1 °C aproximadamente durante 2 horas y 45 minutos, y a continuación se procede a la interpretación de los resultados que se realiza a partir del color que presentan los pocillos en la cara inferior de la placa calificándolos como:

- Color amarillo: negativo
- Color intermedio: dudoso
- Color violeta: positivo

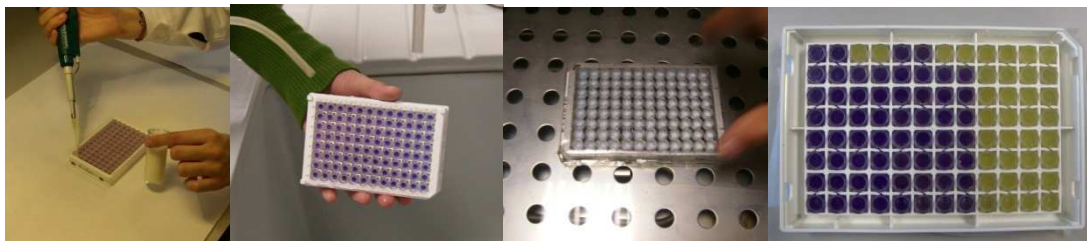


Figura 19. Procedimiento analítico del método microbiológico Eclipse 100

1.4.1.6. Eclipse 50

El Eclipse 50 (Zeu-Inmunotec, Zaragoza, España) empleado se presenta en formato microplaca de 96 pocillos y también contiene púrpura de bromocresol como indicador.

Para la correcta utilización del método hay que aplicar 50 μ L de leche en cada pocillo y posteriormente realizar una incubación en baño de agua a 65 ± 1 °C durante 3 horas.

Seguidamente, los resultados se valoran de forma visual de la siguiente forma:

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



Como en los métodos microbiológicos descritos anteriormente se presenta en la Figura 20 el procedimiento utilizado para el análisis de las muestras de leche.

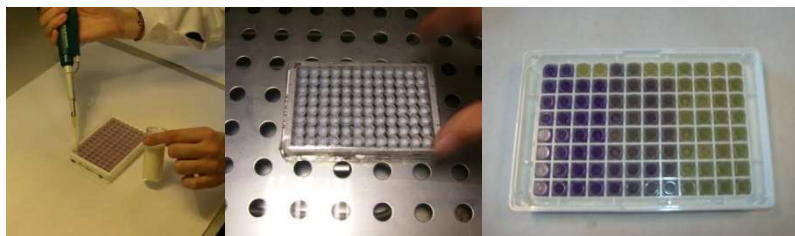


Figura 20. Procedimiento analítico del método microbiológico Eclipse 50

1.4.2. Métodos específicos (cualitativos de confirmación)

Los métodos de confirmación cualitativa son métodos específicos que permiten la detección de uno o dos grupos de antibióticos.

Sus características y el procedimiento indicado por el fabricante se resumen a continuación.

Método microbiológico

1.4.2.1. Equinox

El método Equinox (Zeu-Inmunotec, Zaragoza, España) es un método microbiológico cualitativo para la detección de quinolonas en diferentes matrices alimentarias como carne, leche y huevos. Como los métodos microbiológicos, presentados anteriormente, se basa en la inhibición del crecimiento bacteriano, pero a diferencia de los otros, el microorganismo de prueba empleado es *Escherichia coli* debido a la sensibilidad que presenta esta bacteria frente a las quinolonas. En este caso el cambio de color se basa en una reacción de óxido-reducción.

El método se presenta en forma de microplaca de 96 pocillos partible. Además contiene viales del microorganismo *E. coli* liofilizado y del medio de cultivo.

Para realizar el análisis en primer lugar hay que proceder a la preparación de la muestra de leche: centrifugar 10 mL de la muestra de leche durante 20 min. a 5000 g/4 °C, eliminar la capa superior de grasa usando una espátula y filtrar usando lana de vidrio, 5 mL de leche filtrada se calientan durante $10 \pm 0,5$ min. a 80 °C y por último se enfrían en agua durante 3-5 min y se diluyen según el tipo de leche (leche de vaca: 1 mL de leche con 2 mL de agua destilada).

Posteriormente, hay que reconstituir el *E. coli* liofilizado con el medio de cultivo y homogenizar durante 10-15 minutos.

Preparada la muestras y el medio de cultivo, se aplican 50 µL de muestra en los pocillos y 200 µL del medio de cultivo, y se mezclan suavemente para su correcta homogenización, se sella con láminas adhesivas y se incuba a 37 °C durante 18 ± 2 horas hasta que el control negativo haya virado a un color marrón anaranjado (Figura 21).

En el caso de interpretar los resultados visualmente se deberá invertir la placa para observar la base de los pocillos, de manera que los pocillos con color azul-violeta se consideran positivos y los de color marrón anaranjado como negativos.

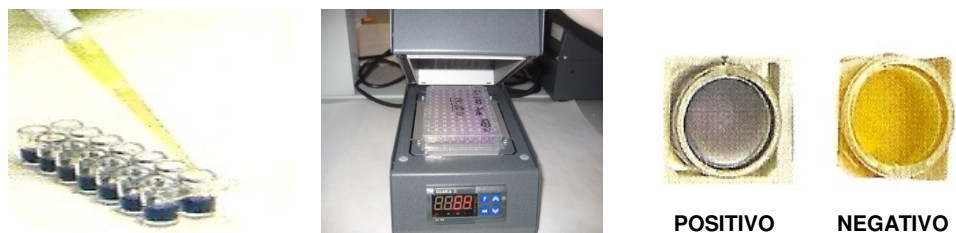


Figura 21. Procedimiento analítico del método microbiológico Equinox

Método enzimático

1.4.2.2. Penzym

El Penzym (UCB Bioproducts, Braine-L'Alleud, Bélgica) es un método colorimétrico empleado en la detección rápida de los antibióticos betalactámicos. Este método está basado en la detección de la inactivación de una enzima, la DD-carboxipeptidasa mediante un indicador de oxidación-reducción.

La unidad suministrada por el fabricante está preparada para 100 determinaciones y contiene un frasco con la enzima DD-carboxipeptidasa, al cual hay que añadir 1 mL de agua destilada al iniciar su uso, un segundo envase que contiene las tabletas con el sustrato R-D-Ala-D-Ala, unas pinzas para la colocación de dichas tabletas y una tabla de color para la interpretación de los resultados.

El procedimiento consiste en añadir en un tubo eppendorf 10 μ L del frasco que contiene la enzima reconstituida y 50 μ L de leche, se mezcla y se incuba 5 minutos a 47 °C. Después se añade la tableta que contiene el sustrato R-D-Ala-D-Ala y se incuba durante otros 7 minutos a la misma temperatura (Figura 22).

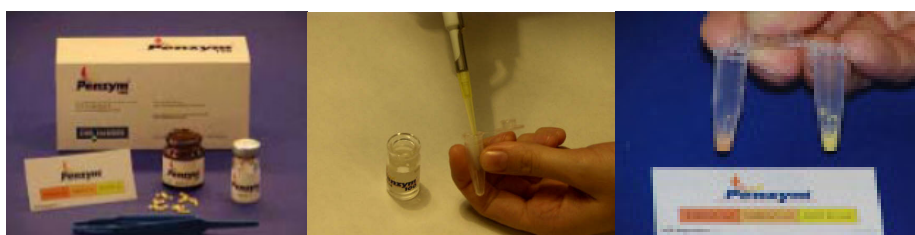


Figura 22. Procedimiento analítico del método enzimático Penzym

La lectura de los resultados se realiza visualmente considerando las muestras:

- Color rojo/naranja: negativo
- Color amarillo/naranja: dudoso
- Color amarillo: positivo



Métodos de unión a receptores proteicos

1.4.2.3. Beta Star

El método Beta Star (UCB Bioproducts, Braine-L'Alleud Bélgica) se presenta en un formato con 25 viales que contienen el receptor y un bote con 25 unidades de tiras reactivas de papel cromatográfico para la determinación de antibióticos betalactámicos en leche.

Para realizar el análisis (Figura 23) se colocan 200 µL de leche en cada pocillo y se incuban en el incubador "Dairy Test Incubator" (Modelo: CMB23, UCB Bioproducts) durante 3 minutos a 47,5 °C. Seguidamente se inserta la tira reactiva en cada vial y se realiza una segunda incubación de 2 minutos a la misma temperatura. Después de la segunda incubación se retira el pocillo del incubador y se procede inmediatamente a la lectura de la tira de papel mediante el lector automático "Reveal Accuscan III" (Modelo: 9590, UCB Bioproducts), aunque también se pueden interpretar visualmente como positivos o negativos de manera que:

- Si la primera línea es más intensa que la línea control, la muestra se considera negativa
- Si la primera línea tiene una intensidad cercana o menor que la línea control, la muestra es positiva

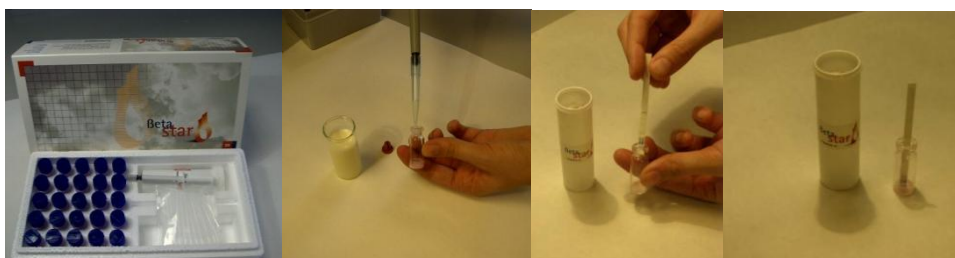
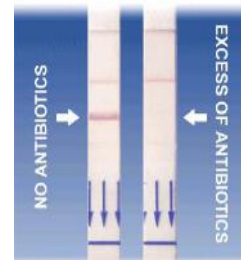


Figura 23. Procedimiento analítico del método de unión a receptores proteicos Beta Star

1.4.2.4. Delvo-X-Press

El Delvo-X-Press (DSM Food Specialties, Delft Holanda) es un método cualitativo para la detección de antibióticos betalactámicos que se presenta en unidades que contienen los siguientes componentes: 50 tubos con el receptor y unas serie de frascos con los reactivos (2 viales con patrón “Standard”, 1 vial de solución de lavado “Wash Solution”, 1 vial de marcador “Tracer” y 1 vial del revelador “Colour Developer”).

Para la realización de la prueba se colocan 200 μ L de la solución patrón “Standard” en un tubo y 200 μ L de leche en el tubo de la muestra. Seguidamente se añaden 200 μ L de la solución marcadora “Tracer” en ambos tubos y se realiza una incubación preliminar a 64 °C durante tres minutos en el “ISRP-workstation” (DSM Food Specialties). Después de esta primera incubación hay que lavar los tubos con la disolución de lavado preparada a partir de la “Wash solution” y agua destilada, y posteriormente se añade 1 mL de “Colour Developer” antes de realizar una segunda incubación durante 3 minutos a 64 °C.

La lectura de los resultados se realiza automáticamente introduciendo el tubo en el “ISRP-workstation” (DSM Food Specialties) indicando a partir de un punto de corte si la muestra es positiva o negativa.

En la Figura 24 se presenta un resumen del procedimiento empleado para el método Delvo-X-Press.



Figura 24. Procedimiento analítico del método de unión a receptores proteicos Delvo-X-Press

1.4.2.5. Rosa Charm (Beta-Lactam MRL, TET y Enroflox)

El Rosa Charm (Charm Sciences, Lawrence, Massachusetts, EEUU) se presenta en forma de tiras reactivas de papel cromatográfico y utiliza la tecnología de difusión por flujo lateral donde todos los componentes del método se encuentran absorbidos en la tira de papel.

Los métodos utilizados han sido el Beta-Lactam MRL (Rosa MRL BL) para la detección de antibióticos betalactámicos, el método New TET (Rosa TET) para la detección de tetraciclinas y el Enroflox para enrofloxacin.

Para realizar el análisis como se muestra el Figura 25 en primer lugar se colocan 300 μL de la muestra de leche en cada tira y se incuban a continuación durante 8 minutos en el “Rosa Incubator” (Modelo: QIS 62493, Charm Sciences) a 56 $^{\circ}\text{C}$. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se procede a la lectura con el lector “Rosa Reader” (RPRX-NB0280, Charm Sciences). Los resultados también se pueden valorar visualmente dependiendo de la intensidad de las bandas de color al lado de la banda control de manera que si la banda de la muestra es más intensa o igual que la banda de referencia, la muestra se considera negativa o por el contrario si la banda de la muestra tiene una intensidad menor que la banda de referencia, la muestra es interpretada como positiva.



Figura 25. Procedimiento analítico del método de unión a receptores proteicos Rosa Charm

1.4.2.6. Snap (BETA-LACTAM, New TETRA Test Kits y Gentamicin)

Se han utilizado los métodos Snap BETA-LACTAM (Snap BL), New TET (Snap TET) y Gentamicin (IDEXX Laboratoires Inc., Westbrook, Maine, EEUU) para la detección de betalactámicos, tetraciclinas y gentamicina respectivamente, que se suministran en bolsas individuales que contienen: un tubo con la pastilla del receptor, una pipeta de plástico y el dispositivo del método.

En todas las versiones de Snap utilizadas el procedimiento descrito es el mismo y se resume en la Figura 26, la única diferencia es el tiempo de incubación empleado en cada caso. Así, se colocan con la pipeta suministrada 450 μL de la muestra de leche al tubo de ensayo con el reactivo. Se agita el tubo para disolver el reactivo y después se realiza una primera incubación a 45 $^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos en el caso de los métodos específicos a betalactámicos y tetraciclinas, y para la gentamicina 2 minutos en el bloque de calentamiento suministrado por el fabricante (Modelo: 95-0942100, IDEXX Laboratoires). Transcurrido este tiempo se vierte el

contenido del tubo dentro del dispositivo Snap. La muestra fluye a través de la ventana de resultados hacia el círculo de activación azul en el caso del método para betalactámicos, rosa para las tetraciclinas y naranja para la gentamicina. Cuando el círculo de activación empieza a desaparecer se presiona el activador y se incuba otros 4 minutos (Snap BL y Snap TET) o 5 minutos (Snap Gentamicin) a 45 °C.

Posteriormente a la incubación se realiza la lectura con el equipo “Snap shot”, (Modelo: 98-09336-00, IDEXX Laboratoires). Este método también permite realizar lecturas visuales indicando si la muestra de leche es positiva o negativa en función de la intensidad del color entre el punto control y el punto de la muestra de forma que:

- Punto de muestra más intenso o igual que punto control, el resultado se valora como negativa
- Punto de muestra menor intensidad que el punto control, la muestra es interpretada como positiva

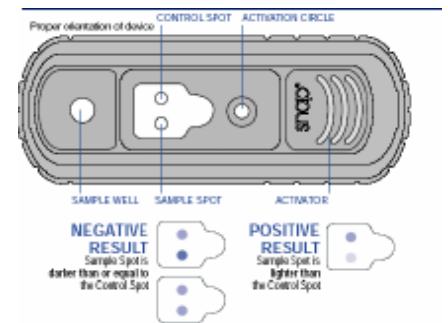


Figura 26. Procedimiento analítico del método de unión a receptores proteicos Snap

1.4.2.7. Twinsensor

El método Twinsensor (Unisensor, Lieja, Bélgica) se presenta en tubo con 25 pocillos y de tiras reactivas. La tira reactiva está compuesta por una membrana cromatográfica con tres líneas de captura, una línea para betalactámicos, una línea control y otra para las tetraciclinas y los pocillos contienen receptores con marcadores específicos para ambos grupos de antibióticos.

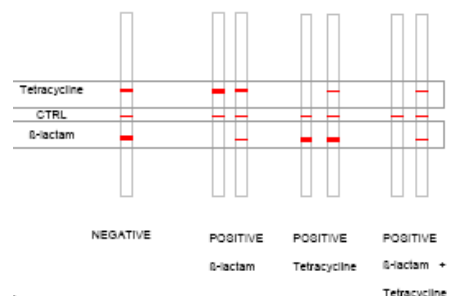
Para la realización del análisis se colocan 200 μ L de leche en cada pocillo, se mezcla homogéneamente y se realiza una primera incubación de 3 minutos a 50 °C en el incubador propio del método (Modelo TDB-100, Unisensor). A continuación las tiras reactivas se colocan en los pocillos con la mezcla de leche y receptores y se realiza una segunda incubación durante otros 3 minutos a 50 °C. Transcurrido dicho tiempo se retiran las tiras de los pocillos y se procede a la lectura mediante el equipo suministrado por el fabricante “ReadSensor” (Modelo: RS00650, Unisensor). En la Figura 27 se presenta el procedimiento utilizado para el análisis de las muestras de leche mediante este método.



Figura 27. Procedimiento analítico del método de unión a receptores proteicos Twinsensor

La interpretación visual de los resultados como positivos o negativos a betalactámicos y/o tetraciclinas se realiza de la siguiente manera:

- Línea muestra más intensa que la línea control, la muestra se considera negativa a los dos antibióticos
- Línea muestra menor intensidad que la línea control, la muestra es interpretada como positiva al grupo de antibióticos que corresponde la banda



1.5. Análisis estadístico

Para poder estudiar las diferencias estadísticas que pudieran existir entre los parámetros calculados (selectividad) en cada uno de los métodos utilizados se realizó un estudio de las frecuencias de los resultados de los métodos de detección, mediante el programa estadístico Statgraphics 5.1 (opción: tabla de contingencia).

En el caso de la sensibilidad el análisis estadístico de los métodos al Límite Máximo de Residuos, se realizó por separado para cada antibiótico y grupo de

métodos (microbiológicos y específicos), mediante la aplicación de la regresión logística a partir del modelo siguiente:

$$L_i = \text{logit} [P_i] = \beta_0 + \beta_1 [M] + \varepsilon_i$$

Dónde: $\text{logit} [P_i]$ = probabilidad de resultados positivos de un método; β_0 , β_1 = coeficientes del modelo; M_i = Método ($M=7$ para los microbiológicos; $M= 6$ para los específicos de betalactámicos) y ε_{ij} = error residual del modelo

El estudio estadístico, se realizó mediante la opción de Regresión Avanzada del programa estadístico Statgraphics (versión 5.1).

2. SEGUNDO ESTUDIO: Estrategia analítica para la detección de residuos de antimicrobianos en la leche de vaca

2.1. Diseño experimental

Con el objeto de establecer la estrategia analítica más idónea para la detección de residuos de antibióticos en la leche, con los resultados obtenidos en el primer estudio de sensibilidad y selectividad de los métodos microbiológicos, enzimático y de unión a receptores proteicos se ha realizado el estudio estadístico que permite establecer similitudes entre los diferentes métodos de cribado empleados en España para la detección de residuos de antimicrobianos en la leche, a fin de poder recomendar un método o una combinación de métodos que permita garantizar la mayor cobertura posible en la detección de antibióticos en la leche.

El diseño experimental correspondiente se ha descrito en el apartado 1.1. de Material y Métodos.

2.2. Muestras de leche

Las muestras de leche utilizadas en este estudio han sido las mismas que las empleadas en el primer estudio del presente trabajo, cuyas características se han descrito el apartado 2.2. de Material y Métodos.

2.3. Sustancias antimicrobianas

Las sustancias antimicrobianas empleadas y la preparación de sus respectivas disoluciones han sido las indicadas en el apartado 1.3. de Material y Métodos.

2.4. Métodos analíticos

Los métodos analíticos empleados para el cálculo de la selectividad y la sensibilidad de los métodos de detección de residuos de antimicrobianos en la leche han sido los descritos en el apartado 1.4. de Material y Métodos.

2.5. Análisis estadístico

2.5.1. Análisis estadístico mediante la técnica de Análisis Multivariante de Conglomerados (Cluster)

Bajo el nombre de Análisis de conglomerados o Cluster se incluyen una serie de técnicas estadísticas multivariantes que persiguen agrupar individuos o variables en grupos con características comunes. De este modo, se forman conglomerados de individuos (o variables) con elevado grado de homogeneidad dentro del cluster y un marcado grado de heterogeneidad con los cluster de los demás individuos (o variables).

Esta técnica, al igual que el Análisis Factorial, no es un procedimiento inferencial, motivo por el cual no será necesario verificar los supuestos de normalidad, homocedasticidad y linealidad. Por el contrario, el análisis de conglomerados se ve muy influenciado por la multicolinealidad de las variables. Además, se debe destacar que el Análisis Cluster depende en forma muy acentuada de las variables incorporadas para establecer las similitudes de los grupos, siendo muy sensible a la "incorporación" o "eliminación" de variables relevantes.

Con el objetivo de establecer asociaciones entre las sensibilidades de los diferentes métodos de cribado utilizados para el control de residuos de antibióticos en leche se utilizó el Análisis de conglomerados ("Cluster"). En este caso concreto, el uso del análisis de conglomerados consiste en establecer asociaciones de métodos de cribado, en función de las distancias de similitud de las variables medidas, o sea la sensibilidad de los diferentes antibióticos estudiados (Análisis tipo R). Aunque esta técnica multivariante también permite establecer asociaciones entre los individuos, es decir las moléculas de los antibióticos analizados, en función de la sensibilidad de los métodos de cribado e identificar posibles casos anómalos (Análisis tipo Q).

Para determinar los conglomerados o "Cluster", se deben establecer previamente los criterios de "similitud" y de "formación de los conglomerados". A partir de los datos de sensibilidad obtenidos con los métodos microbiológicos y específicos, se aplicó el análisis de conglomerados utilizando el "Método de Ward" para la formación de los conglomerados y la "Distancia Euclídea cuadrática" como medida de similitud a los valores de sensibilidad de los antibióticos analizados, todo ello mediante el Análisis Cluster de la opción Multivariante incluida en el programa estadístico Statgraphics (versión 5.1). A partir de los resultados de esta técnica estadística se podrá excluir aquellas moléculas de antibióticos que no son detectados por ninguno de los métodos de cribado existentes actualmente en el mercado (Análisis tipo Q).

En una segunda etapa se empleó el análisis de conglomerados a los resultados de sensibilidad de los métodos de cribado, es decir un análisis a las variables (Análisis Tipo R). Este procedimiento estadístico permite establecer asociaciones de métodos según su similitud para las sensibilidades hacia los diferentes antimicrobianos. Al igual que en el caso anterior, se utilizó el "Método de Ward" para la formación de los conglomerados y la "distancia Euclídea cuadrática" como medida de similitud.

2.5.2. Análisis estadístico mediante el Análisis por Componentes Principales (PCA)

El Análisis por Componentes Principales (del inglés Principal Component Analysis, PCA) es una técnica estadística multivariante que se emplea para reducir la información disponible en una matriz de datos. Se trata de técnica estadística ampliamente utilizada en campos disciplinares muy diversos tales como biología, agronomía, veterinaria, microbiología, química, ciencia y tecnología de los alimentos, entre otros.

El PCA se utiliza para resumir la información contenida en un conjunto de variables a un subconjunto de nuevos ejes llamados "Componentes Principales" con pérdida mínima de la información.

En el PCA se extraen factores que contienen elevadas proporciones de varianzas común y bajas proporciones de varianzas específicas y de error. En este sentido, se trata de explicar el sistema mediante un número reducido de Componentes Principales con pérdida mínima de la varianza no explicada.

En el momento de realizar la interpretación del análisis estadístico se debe considerar que el primer factor puede interpretarse como la mejor relación lineal que los datos manifiestan, mientras que el segundo factor será la segunda mejor combinación lineal de variables. Este segundo factor se calcula a partir de la varianza residual que queda libre después de haber extraído el primer factor y explicará el mayor porcentaje de esta varianza residual.

Las "cargas" (loadings) de cada variable representan la correlación que existe entre la variable original y el factor en cuestión. Las cargas factoriales próximas a + 0.3 se las considera de mínimo nivel, las cargas cercanas a + 0.4 son más importantes y las cargas mayores a + 0.5 se consideran significativas. Cuanto más grande sea el valor de la carga, tanto mayor será la importancia de ese factor en el eje factorial. Las cargas bajas no tendrán peso en el factor principal y por lo tanto no contribuirán a su posterior interpretación.

En muchos casos, un simple análisis de las cargas no alcanza a poner de manifiesto las relaciones existentes entre los datos y será necesario proceder a llevar a cabo alguna rotación de los factores principales. La rotación más utilizada es la Varimax que permite maximizar la suma de las varianzas de las cargas requeridas en la matriz de factores.

En el presente estudio, después de establecer las asociaciones de métodos de cribado mediante la técnica de conglomerados, se aplicó el PCA a cada uno de los dos subgrupos de métodos de cribado utilizados, es decir, a los métodos microbiológicos y a los métodos específicos, con el propósito de establecer similitudes entre ellos, a través de los datos de sensibilidad. A continuación se aplicó una rotación Varimax y se representaron en los nuevos ejes principales la ubicación de los diferentes métodos microbiológicos y específicos. Todo ello mediante la opción de Análisis Factorial incluida en el programa estadístico Statgraphics (versión 5.1).

2.5.3. Cálculo del porcentaje de detección de antibióticos a partir de las frecuencias de uso en España

Teniendo en cuenta las frecuencias de uso de los antibióticos (f_A) utilizados en el tratamiento de enfermedades del ganado vacuno lechero presentadas en el Cuadro 4 de la Introducción y la sensibilidad de cada método (microbiológico y de receptores proteicos) para las diferentes moléculas de antibióticos ($S_{M,A}$) se calcularon los porcentajes de detección de cada método para la molécula "A" de antibiótico ($pd_{M,A} = f_A \cdot S_{M,A}/100$). Posteriormente, se calculó el Porcentaje de Cobertura de cada método (PC_M) para cada antibiótico ensayado (con una frecuencia de uso superior al 1%) según la siguiente expresión matemática:

$$PC_M = \sum_{A=1}^{A=n} pd_{M,A} \quad (\text{Ecuación I})$$

Además, se consideró interesante evaluar el porcentaje de cobertura que se logrará mediante el uso simultáneo de dos metodologías analíticas diferentes (microbiológicos y específicos). Para ello, se sumaron los porcentajes de detección para cada molécula "A" ($pd_{M,A}$) para aquel método que presenta una mayor sensibilidad hacia cada molécula de antibiótico, dado que será detectada por un método con mayor probabilidad que por el otro método.

Los porcentajes de cobertura (PC_{M1+M2}) para el uso simultáneo de un método microbiológico (1) y un método específico (2) se calcularon mediante la siguiente expresión:

$$PD_{M1+M2} = \sum_{A=1}^{A=n} pd_{M,A}(\text{Microbiológico} / \text{Receptores}) + \sum_{A=1}^{A=n} pd_{M,A}(\text{Receptores} / \text{Microbiológico})$$

(Ecuación II)

Donde “ $pd_{M,A}$ (microbiológico/receptores)” significa la probabilidad de detección que presenta el método microbiológico para un antibiótico “A” dado que no fue detectado por el método de receptores o que la sensibilidad del método de receptores para dicho antibiótico haya resultado inferior a la correspondiente al método microbiológico, mientras que “ $pd_{M,A}$ (Receptores/Microbiológico)” es la probabilidad de detección del método de receptores proteicos para un antibiótico “A” dado que no fue detectado por el método microbiológico o que la sensibilidad del método microbiológico para dicha molécula de antibiótico haya resultado inferior a la de receptores proteicos para una molécula determinada.

Los cálculos de la probabilidad de detección para cada antibiótico se efectuaron según las siguientes expresiones:

$$pd_{M,A}(\text{Microbiológico} / \text{Receptores}) = \frac{f_A \cdot S_{M,A}}{100}$$

$$pd_{M,A}(\text{Receptores} / \text{Microbiológico}) = \frac{f_A \cdot S_{M,A}}{100}$$

(Ecuación III)

Donde f_A es la frecuencia de uso del antibiótico “A” en España, $S_{M,A}$ es la sensibilidad relativa porcentual del método “M” (microbiológico o de receptores proteicos) para el antibiótico “A”, y $pd_{M,A}$ es el poder de detección del método de cribado (microbiológico o de receptores proteicos) para el antibiótico “A”.

3. TERCER ESTUDIO: Influencia de los factores relacionados con la toma de muestras sobre la respuesta de los métodos microbiológicos de detección de antibióticos en la leche de vaca

3.1. Diseño experimental

Con el propósito de evaluar el efecto del tiempo de refrigeración y la presencia de azidiol, se emplearon muestras de leche procedentes de los tanques de diferentes explotaciones de ganado vacuno lechero. Estas muestras de leche se fraccionaron en

dos alícuotas: una sin conservante y otra con azidiol, y se les adicionaron 12 concentraciones de los 4 antibióticos seleccionados para este estudio (3 betalactámicos: amoxicilina, ampicilina y penicilina G y 1 tetraciclina: oxitetraciclina) y se analizaron a las 0, 24, 48 y 72 horas de almacenamiento a 4 °C de la leche, mediante los métodos microbiológicos BRT AiM, Delvotest MCS Accelerator y Eclipse 100 (Figura 28).

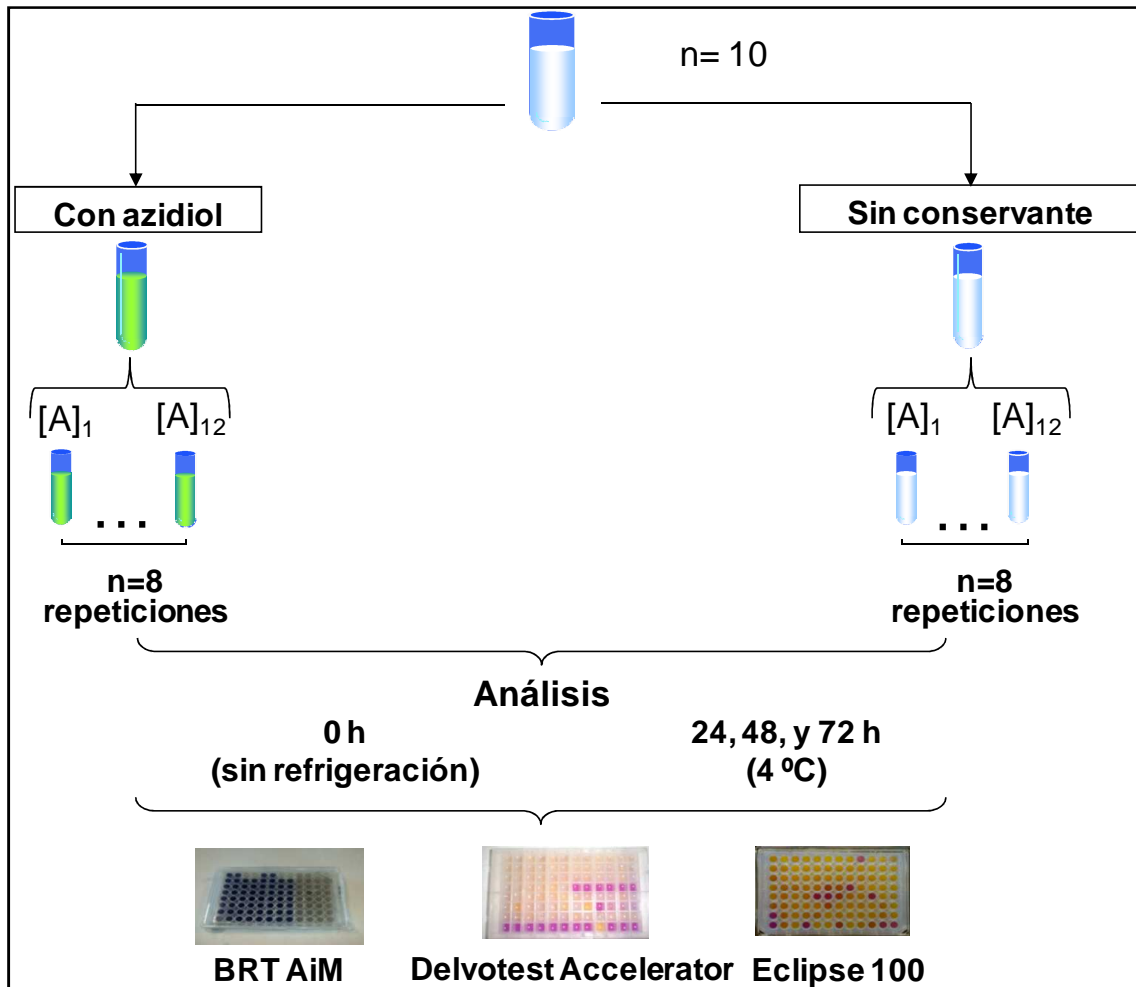


Figura 28. Diseño experimental del estudio sobre la influencia de factores relacionados con la toma de muestras sobre la respuesta de los métodos microbiológicos de cribado

3.2. Muestras de leche

Las muestras de leche cruda de vaca procedían de la recogida diaria de distintas explotaciones ganaderas y fueron proporcionadas por la empresa DANONE S.A, con una frecuencia semanal de la planta situada en Aldaia (Valencia). Todas las muestras se analizaban en el Laboratorio Interprofesional Lechero de la Comunidad Valenciana (LICOVAL) para la determinación de su composición en grasa, proteína, el recuento de gérmenes y de células somáticas y así garantizar que las muestras de

leche empleadas en el estudio cumplían con los requisitos de composición y calidad señalados en la norma UNE- EN ISO 13969 (2003a).

Las muestras de leche utilizadas en el estudio contenían entre un 3 y 4 % de grasa, un porcentaje de proteína entre 3 y 3,5 %, un recuento de células somáticas entre 130.000 y 400.000 células/ml y recuento de gérmenes 9.000 y 100.000 ufc/ml.

El azidiol se preparó siguiendo las indicaciones del Real Decreto 1728/2007. Para ello se disuelven 0,75 g de cloranfenicol en 10 ml de etanol al 96%, añadiendo seguidamente 900 mL de agua destilada. A continuación se incorpora 18 g de azida sódica y para estabilizar el valor del pH se añadían 45 g de trisodio citrato, manteniendo la mezcla en baño de agua a 50° C en agitación hasta la disolución completa de los reactivos. Se enfría y enrasa con agua estéril a 1000 mL, utilizando como colorante 35 mg de azul de bromofenol. La dosis empleada fue de 33 µL del conservante por cada 10 mL de leche (Real Decreto 1728/2007: 133 µL en 40 mL).

3.3. Sustancias antimicrobianas

Para realizar el estudio se utilizaron 12 concentraciones diferentes de cada uno de los antibióticos, estas variaban para cada método según los límites de detección del mismo indicados por las diferentes casas comerciales. En el Cuadro 15 se presentan los antibióticos estudiados, junto con las concentraciones empleadas en cada uno de los experimentos realizados, así como el disolvente utilizado, la referencia de la casa comercial, junto el Límite Máximo de Residuos para cada sustancia y el límite de detección de cada uno de los métodos.

Las disoluciones de los antimicrobianos, así como las muestras de leche fortificadas empleadas en este estudio se prepararon siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 1.3. de Material y Métodos.

3.4. Métodos microbiológicos

Los métodos microbiológicos utilizados fueron el Brilliant Black Reduction Test MRL, Delvotest MCS Accelerator y Eclipse 100, que fueron descritos anteriormente en el apartado 1.4. de Material y Métodos.

Cuadro 15. Sustancias antimicrobianas y concentraciones empleadas en el estudio de la influencia de los factores relacionados con la toma de muestras sobre la respuesta de los métodos microbiológicos de cribado

Sustancias antimicrobianas		Concentración (µg/Kg)		Disolvente	Ref., comercial
LMR (µg/Kg)	Método	L.D (µg/Kg)			
Penicilinas	BRT AiM	2-3	0 / 0,5 / 0,75 / 1 / 1,25 / 1,50 / 1,75 / 2 / 2,50 / 3 / 3,50 / 4	H ₂ O	Sigma A-8523
	Delvotest	2-3	0 / 1 / 1,25 / 1,75 / 2 / 2,25 / 2,5 / 2,75 / 3 / 3,25 / 3,75		
	Eclipse 100	5	0 / 2 / 2,25 / 2,5 / 2,75 / 3 / 3,25 / 3,5 / 4 / 4,5 / 5 / 5,25		
Ampicilina	BRT AiM	2-3	0 / 0,25 / 0,50 / 0,75 / 1 / 1,25 / 1,50 / 2 / 2,25 / 2,50 / 2,75 / 3	H ₂ O	Sigma A-9518
	Delvotest	4	0 / 1,5 / 1,75 / 2 / 2,5 / 2,75 / 3 / 3,25 / 3,5 / 3,75 / 4 / 4,5		
	Eclipse 100	5	0 / 1 / 1,25 / 1,5 / 1,75 / 2 / 2,25 / 2,5 / 2,75 / 3 / 3,5 / 3,75		
Penicilina G	BRT AiM	1,5-2	0 / 0,4 / 0,6 / 0,8 / 1 / 1,2 / 1,3 / 1,4 / 1,5 / 1,6 / 1,8 / 2	H ₂ O	Sigma Pen-Na
	Delvotest	1-2	0 / 0,25 / 0,5 / 0,75 / 1 / 1,25 / 1,5 / 1,75 / 2 / 2,25 / 2,50 / 2,55		
	Eclipse 100	4	0 / 1 / 1,25 / 1,5 / 1,75 / 2 / 2,25 / 2,5 / 2,75 / 3 / 3,5 / 4		
Tetraciclinas		L.D (µg/Kg)			
	BRT AiM	250-500	0 / 50 / 100 / 150 / 200 / 225 / 250 / 300 / 350 / 400 / 450 / 500	HCl 0,1N	Sigma O-5750
	Delvotest	250-500	0 / 200 / 225 / 250 / 275 / 300 / 325 / 350 / 375 / 400 / 425 / 450		
Eclipse 100	140	0 / 60 / 80 / 100 / 120 / 140 / 160 / 180 / 200 / 220 / 240 / 260			

LMR: Límite máximo de residuos; LD: Límite de detección establecido por el fabricante

3.5. Análisis estadístico

Debido a que el modelo de regresión lineal no es adecuado cuando se emplea una escala ordinal a dos niveles (negativo y positivo), se utilizó para el cálculo de los límites de detección un modelo de regresión logística multinomial aplicando el estudio estadístico, se realizó mediante la opción de Regresión Avanzada del programa estadístico Statgraphics (versión 5.1).

El análisis estadístico utilizado para estudiar el efecto del conservante (azidiol) y el tiempo de refrigeración sobre la respuesta de los diferentes métodos microbiológicos, se realizó según el siguiente modelo:

$$L_{ijkl} = \text{logit} [P_{ijkl}] = \beta_0 + \beta_1 C_i + \beta_2 R_j + \beta_3 A_k + \beta_{2,3} R_j * A_k + \varepsilon_{ijkl} \quad (\text{Ecuación IV})$$

Dónde: L_{ijkl} = Modelo logístico; $[P_{ijkl}]$ = probabilidad de una respuesta positivo o negativo; β_0 = ordenada al origen; β_1 , β_2 y β_3 = parámetros estimados por el modelo logístico; C_i = efecto de la concentración ($n=12$); R_j = efecto del tiempo de refrigeración ($n = 4$); A_k = efecto del conservante, expresado en términos de variables Dummy: (muestras sin conservante $A=0$; muestras conservadas con azidiol $A=1$); $R_j * A_k$ = interacción entre el tiempo de refrigeración y azidiol y ε_{ijk} = error residual.

Con el propósito de evaluar la pérdida relativa de la actividad antimicrobiana de los antibióticos en la leche debido al tiempo de refrigeración, se decidió trabajar en una zona de la curva dosis-respuesta donde cada método de cribado presenta una buena sensibilidad para medir esta propiedad. Por ello, se eligió el Límite de Detección (LD) de cada sustancia calculado como la concentración que produce el 95% de resultados positivos (UNE-EN ISO 13969/2003a) en las muestras de leche sin conservante y sin refrigerar. Una vez calculado el límite de detección, se aplicó la Ecuación V con el fin de calcular para cada antibiótico a una concentración equivalente a su LD y según el tiempo de refrigeración (0, 24, 48 o 72 horas) la frecuencia de resultados positivos del método (FR_j).

$$FR_j = \left[\frac{e^{(\beta_0 + \beta_1 LD + \beta_2 R_j + \beta_3 A_k + \sum \beta_{23} R_j * A_k)}}{1 + e^{(\beta_0 + \beta_1 LD + \beta_2 R_j + \beta_3 A_k + \sum \beta_{23} R_j * A_k)}} \right] \quad (\text{Ecuación V})$$

Posteriormente se calculó la pérdida relativa porcentual de actividad antimicrobiana (% PAA) mediante la siguiente expresión:

$$\%PAA = \frac{95 - FR_j}{95} \times 100 \quad (\text{Ecuación VI})$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. PRIMER ESTUDIO: Evaluación de los métodos de detección de residuos de antimicrobianos en la leche de vaca

1.1. Selectividad de los métodos

1.1.1. Métodos microbiológicos

Los resultados obtenidos en el estudio de la selectividad de los métodos microbiológicos para el que se analizaron, por triplicado, 100 muestras de leche procedentes de animales individuales se presentan en el Cuadro 16, donde se resumen las frecuencias de resultados negativos, dudosos y positivos junto con la selectividad (n° muestras negativas/total de muestras x 100).

Cuadro 16. Resultados del análisis de muestras de leche de vaca procedentes de animales no tratados mediante los métodos microbiológicos

Métodos microbiológicos	Resultados			Selectividad (%)
	Negativos	Dudosos	Positivos	
BRT AiM	99	1	0	99
Blue Yellow	100	0	0	100
CMT Copan	100	0	0	100
Delvotest MCS ¹	98	0	2	98
Delvotest SP-NT	98	1	1	98
Eclipse 50	99	1	0	99
Eclipse 100	99	1	0	99

¹Delvotest MCS Accelerator

Como se observa en dicho Cuadro, todos los métodos microbiológicos ensayados presentan selectividades muy elevadas, con porcentajes desde el 98% en el caso de los métodos Delvotest MCS Accelerator y Delvotest SP-NT hasta el 100% para los métodos Blue Yellow y CMT Copan.

En los métodos BRT AiM, Eclipse 50 y Eclipse 100 se observa solo un resultado dudoso pero ninguno positivo. Por el contrario, en las dos versiones de Delvotest sí que se encuentran resultados positivos (2: Delvotest MCS Accelerator y 1: Delvotest SP-NT).

Se debe considerar que estos resultados conocidos como “falsos positivos”, se pueden deber a causas distintas a la presencia de residuos de antibióticos, dado que las muestras de leche procedían de animales que no habían recibido ningún tratamiento medicamentoso. Estos “falsos positivos” pueden suponer un coste

innecesario en el mecanismo de control, ya que deben confirmarse con un posterior análisis por métodos cuantitativos, tales como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), antes de aplicar las sanciones correspondientes. Además, pueden dar lugar a penalizaciones injustas a los ganaderos.

Otro aspecto a tener en cuenta relacionado con los resultados dudosos, es el modo de interpretación de los resultados, ya que cuando es visual basado en el cambio de color del indicador contenido en el medio de cultivo de los métodos microbiológicos los resultados están sujetos a un elevado nivel de subjetividad, motivo por el cual algunos autores sugieren el uso de un lector fotométrico con el propósito de evitar errores de interpretación de las respuestas de estos métodos de cribado (Althaus y col., 2003).

Otros autores proponen realizar un segundo análisis para aquellos resultados dudosos o positivos, calentando previamente la muestra (80 °C/10 min) para inactivar algunos de los inhibidores naturales presentes en las muestras de leche (Schelegelova y Rysanek, 2000; Molina y col., 2003a), ya que este tipo de métodos inespecíficos pueden verse afectados, en determinadas circunstancias, por algunos factores relacionados con la composición de la leche (inhibidores naturales) o el nivel de células somáticas.

En cuanto a la aplicación de métodos microbiológicos en leche de oveja, Continanza y col. (2003) realizaron un estudio sobre la detección de antibióticos en leche mediante el método CMT Copan, donde determinaron una selectividad para leche de oveja del 86%. Los resultados “falsos positivos” coincidieron con las muestras de leche que tenían recuentos de células somáticas elevados. En cambio, Reybroeck (2004) obtiene bajas interferencias de los inhibidores naturales de la leche de oveja en el CMT Copan.

Montero y col. (2005) calculan para la leche de oveja una selectividad del 99% con el Eclipse 100 “ov”. También Althaus y col. (2003) indican para el método BRT AiM un porcentaje de resultados “falsos positivos” de 3,75% (96,2% selectividad) y del 4% para el Delvotest (96% selectividad).

En otro estudio realizado también en leche de oveja donde se analizaban cada mes una serie de muestras procedentes de tanques de explotaciones ganaderas en Castilla-La Mancha para hacer quesos con denominación de origen (Yamaki y col., 2006), se evaluó la capacidad de la versión Eclipse 100 ov (versión especial para leche de oveja, que ha dejado de fabricarse) para detectar diferentes sustancias antimicrobianas que podían estar presentes en las muestras de leche.

Estos autores obtuvieron un porcentaje de resultados positivos a lo largo de todo el experimento (1 año) del 2,6%. El calentamiento de 82 °C durante 10 minutos redujo el porcentaje de resultados positivos hasta un 0,9% lo que indica que algunos de estos resultados podía ser causado por la presencia de inhibidores naturales.

Con la finalidad de evaluar de un modo estadístico la selectividad de los métodos microbiológicos ensayados, se utilizó la prueba del chi-cuadrado, acompañada de la prueba exacta de Fisher para bajas frecuencias de resultados dudosos o positivos. A partir de dicho análisis se obtiene un valor de chi-cuadrado no significativo ($\chi^2 = 11,71$; $p < 0,4695$) por lo que se puede establecer que no existen diferencias entre los valores de selectividad encontradas en los diferentes métodos microbiológicos utilizados, indicando que los resultados son comparables entre sí.

1.1.2. Métodos específicos (cualitativos de confirmación)

En el Cuadro 17 se presentan los resultados negativos, dudosos y positivos del método enzimático Penzym, así como aquellos basados en la unión de receptores proteicos para la detección de antibióticos betalactámicos.

Como se aprecia en el Cuadro 17 el método Penzym presenta el valor de selectividad más bajo, con un porcentaje del 82%, debido a que se interpretaron 17 resultados como dudosos además de un resultado positivo ("falso positivo"). Hay que tener en cuenta que el método Penzym fue el único método específico cuyos resultados se interpretaron de forma visual lo que implica una mayor subjetividad, ya que pueden aparecer resultados difíciles de interpretar que se pueden clasificar como dudosos. Este hecho puede ser debido, a que al ser un método enzimático, las reacciones que se producen provocan un cambio de coloración en muchos casos no muy definido.

Cuadro 17. Resultados del análisis de muestras de leche de vaca procedentes de animales no tratados mediante los métodos específicos para betalactámicos

Métodos específicos	Resultados			Selectividad (%)
	Negativos	Dudosos	Positivos	
Penzym*	82	17	1	82
Beta Star	97	-	3	97
Delvo XP	99	-	1	99
Rosa MRL BL	100	-	0	100
Snap BL	100	-	0	100
Twinsensor BL	98	-	2	98

*La lectura se realizó visualmente clasificando los resultados como negativos, dudosos y positivos

Hay que indicar que el procedimiento aplicado en el Penzym es el indicado por el fabricante, una primera incubación a 47 °C durante 5 min. y una segunda de 7 min. a la misma temperatura (total 12 minutos). Es posible que con la prolongación de los tiempos de incubación los resultados hubieran sido diferentes. En este sentido, Molina y col. (2002) cuando analizan leche de oveja con el método Penzym señalan una selectividad del 82,8% al aplicar los tiempos y la temperatura de incubación indicada por el fabricante (1ª incubación: 5 min.-47 °C/ 2ª incubación: 8 min.-47° C) que mejora hasta un 97,1% al alargar la segunda incubación 15 minutos más del tiempo recomendado por el fabricante (22 minutos).

El resultado del método Penzym obtenido en este estudio es igual al señalado por Seymour y col. (1988), que determinaron un 17% de resultados positivos (“falsos positivos”). En cambio, este valor es inferior al calculado por Andrew y col. (1997) que indican una selectividad del 90,1% (9,9% de “falsos positivos”).

En los métodos de unión a receptores proteicos, para la interpretación de los resultados se utilizaron equipos de lectura comerciales que clasifican, a partir de un punto de corte (“cut-off”) establecido por el fabricante, los resultados como positivos o negativos.

Respecto a los valores de selectividad de los métodos específicos (Cuadro 17), son muy elevadas con porcentajes del 97% (Beta Star), 98% (Twinsensor), 99% (Delvo XP) y 100% (Snap BL, Rosa BL).

En cuanto a los resultados obtenidos por otros autores Angelidis y col. (1999) calcularon un 94% de resultados negativos con el método Delvo-X-Press (Delvo XP) en muestras de leche procedentes de vacas individuales, porcentaje inferior al obtenido en este estudio (99%). En cambio, al utilizar este método en muestras de leche de tanque Mitchell y col. (1995) no obtuvieron resultados “falsos positivos” (100% de selectividad).

Empleando leche de oveja, Berruga y col. (2009) calcularon con los métodos Twinsensor BL (95%) y Snap BL (99%, valores de selectividad elevados, similares a los obtenidos en este estudio, pero menores para el Rosa Charm BL (90%). Esto podría deberse a la diferente composición que presenta la leche de oveja respecto a la de vaca, lo que indica la necesidad de modificar el protocolo de análisis para muestras de leche de la leche ovina a fin de disminuir el porcentaje de resultados “falsos positivos”.

Como en el caso de los métodos microbiológicos se realizó un análisis estadístico de la selectividad de los métodos específicos para betalactámicos obteniendo en este caso un valor de chi-cuadrado significativo ($\chi^2 = 95,83$; $p < 0,001$). Para evaluar a que método se deben estas diferencias se ha estudiado la contribución al valor de chi-cuadrado de los distintos resultados de los métodos. Estos resultados se presentan en el Cuadro 18, donde se observa que el método Penzym es el que mayor contribución presenta al test chi-cuadrado ($\chi^2 = 70,83$).

Por ello se volvió a repetir el análisis, excluyendo los resultados del método Penzym con el objeto de analizar si las diferencias estadísticas encontradas se debían exclusivamente a este método. En esta ocasión el análisis no muestra una significación estadística ($\chi^2 = 31,13$; $p < 0,311$), por lo que se puede concluir que la selectividad de los métodos específicos es equiparable entre sí, a excepción del Penzym.

Cuadro 18. Frecuencia (%) y test de chi-cuadrado (χ^2) de los resultados de los métodos específicos con muestras de leche procedentes de animales no tratados

Métodos	Resultado		
	Negativo	Dudoso	Positivo
	Frecuencia (%) Contribución χ^2	Frecuencia (%) Contribución χ^2	Frecuencia (%) Contribución χ^2
Penzym	82 2,13	17 70,83	1 0,03
Beta Star	97 0,00	0 2,83	3 2,88
Delvo XP	99 0,09	0 2,83	1 0,02
Rosa MRL BL	100 0,17	0 2,83	0 1,17
Snap BL	100 0,17	0 2,83	0 1,17
Twinsensor BL	98 0,04	0 2,83	2 0,60

A continuación se muestra en el Cuadro 19, la selectividad calculada con los métodos específicos en el análisis de tetraciclinas. En este caso todos los resultados se obtuvieron a partir de los equipos automáticos de cada método no existiendo la posibilidad de resultados dudosos. Como se observa todos los porcentajes de selectividad son muy elevados: Snap TET 100%, Rosa TET 99% y Twinsensor 98%, y no se encuentran diferencias significativas entre ellos ($\chi^2 = 2,01$; $p < 0,3667$).

Cuadro 19. Resultados del análisis de muestras de leche de vaca procedentes de animales no tratados mediante los métodos específicos para tetraciclinas

Métodos específicos	Resultados		Selectividad (%)
	Negativos	Positivos	
Rosa TET	99	1	99
Snap TET	100	0	100
Twinsensor TET	98	2	98

Los resultados calculados en este estudio son superiores a los obtenidos por Berruga y col. (2009) en muestras de leche de oveja, que obtuvieron una selectividad para el método Snap TET del 96%, Twinsensor TET 97% y Rosa TET del 99%. Lo que indica la necesidad de adaptar el protocolo para analizar muestras de leche de esta especie.

A su vez en el Cuadro 20 se presentan los resultados de otros métodos específicos como son el Equinox y Rosa Enroflox para la detección de enrofloxacina y del Snap Gentamicin para el análisis de la gentamicina. Para los métodos Equinox y Rosa Enroflox los valores de selectividad son muy elevados (99% y 100%, respectivamente), al igual que el método específico para la gentamicina (100%).

Cuadro 20. Resultados del análisis de muestras de leche de vaca procedentes de animales no tratados mediante los métodos específicos para quinolonas y gentamicina

Métodos específicos	Resultados		Selectividad (%)
	Negativos	Positivos	
Equinox	99	1	99
Rosa Enroflox	100	0	100
Snap Gentamicin	100	0	100

1.2. Sensibilidad de los métodos

Los resultados del cálculo de la sensibilidad de los métodos de cribado para diferentes antibióticos, seleccionados según su uso en el tratamiento de enfermedades del ganado vacuno lechero, se resumen en los siguientes apartados. En el cálculo de la sensibilidad (n° muestras positivas/ n° muestras analizadas x 100) los resultados que se interpretaban como dudosos se han contabilizado en todos los casos como positivos.

1.2.1. Antibióticos betalactámicos

1.2.1.1. Métodos microbiológicos

La sensibilidad obtenida en los métodos microbiológicos para diferentes antibióticos betalactámicos a concentraciones equivalentes a 0,5 LMR, LMR y 2 LMR se presenta en el Cuadro 21.

En dicho Cuadro, se observa que en el caso de las penicilinas (amoxicilina, ampicilina, cloxacilina, dicloxacilina y penicilina G) los métodos microbiológicos presentan, en general, sensibilidades elevadas entre el 70 y el 100% a una concentración equivalente al LMR, excepto en casos concretos como la nula sensibilidad (0%) de los métodos Eclipse 100 y el Eclipse 50 para la cloxacilina.

Otros autores (Reybroeck, 2004; Žirdauskienė y Šalomskienė, 2006; Le Breton y col., 2007) también determinaron una buena sensibilidad del test CMT Copan en muestras de leche de vaca para la detección de residuos de antibióticos betalactámicos, salvo para la cefquinoma, a niveles cercanos a los límites establecidos por la Unión europea (LMRs). Como se puede observar en el Cuadro 21 la sensibilidad obtenida para el CMT Copan en antibióticos betalactámicos también resulta adecuada para todos los betalactámicos excepto para la cefquinoma y el ceftiofur.

También Scanella y col. (1997) estudiaron la sensibilidad del método Delvotest SP a la penicilina, ampicilina y cloxacilina obteniendo un 100% de sensibilidad a 3, 6 y 30 $\mu\text{g/L}$, respectivamente. En cambio en este trabajo para la penicilina G con el Delvotest MCS Accelerator se ha obtenido este mismo resultado a 2 $\mu\text{g/Kg}$ y con el Delvotest SP-NT a 4 $\mu\text{g/Kg}$, y para la ampicilina y la cloxacilina en ambos métodos al LMR.

A su vez, los resultados obtenidos en los métodos Delvotest MCS Accelerator y Delvotest SP-NT en el análisis de la cloxacilina al LMR, son similares a los calculados por Mc Grane y col. (1996) para el método Delvotest SP ya que estos autores calcularon un 98% de resultados positivos.

Del mismo modo, Suhren y col. (1997) al estudiar en el método Delvotest SP la cloxacilina a 30 $\mu\text{g/L}$ (LMR) y 15 $\mu\text{g/L}$ (0,5 LMR) calcularon un 100% de resultados positivas al LMR, mientras que las muestras de leche con 15 $\mu\text{g/L}$ (0,5 veces LMR) de cloxacilina presentaron un 52,9% a diferencia de las versiones Delvotest utilizadas que en este estudio, en las cuales a 0,5 LMR se calcularon sensibilidades muy bajas o incluso nulas (6,7%: Delvotest MCS Accelerator y 0%: Delvotest SP-NT).

Cuadro 21. Sensibilidad (%) de los métodos microbiológicos para la detección de antibióticos betalactámicos

Método	Nivel	Antibiótico (LMR:µg/Kg)										
		Amoxicilina (4)	Ampicilina (4)	Cloxacilina (30)	Dicloxacilina (30)	Penicilina G (4)	Cefalexina (100)	Cefalotio (20)	Cefoperazona (50)	Cefquinoma (20)	Ceftiofur (100)	
BRT AIM	0,5 LMR	26,7	73,3	0	100	100	100	100	100	0	0	0
	LMR	100	100	100	100	100	100	100	100	0	0	0
Blue Yellow	2 LMR	100	100	100	100	100	100	100	100	0	0	100
	0,5 LMR	0	10	0	100	66,7	16,7	76,7	0	50	0	0
CMT Copan	LMR	86,7	70	100	100	100	90	100	100	70	100	100
	2 LMR	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Delvotest MCS	0,5 LMR	0	0	0	100	73,3	96,7	0	90	0	0	0
	LMR	100	100	100	100	100	100	100	100	0	0	0
Delvotest SP-NT	2 LMR	00	100	100	100	100	100	100	100	0	0	100
	0,5 LMR	36,7	0	6,7	46,7	100	10	0	20	0	53,3	0
Eclipse 50	LMR	96,7	100	100	80	100	90	76,7	100	0	100	100
	2 LMR	100	100	100	100	100	100	86,7	100	0	100	100
Eclipse 100	0,5 LMR	26,7	56,7	0	100	26,7	93,3	100	10	0	0	0
	LMR	83,3	100	100	100	100	96,7	100	100	0	0	0
Eclipse 50	2 LMR	100	100	100	100	100	100	100	100	0	0	100
	0,5 LMR	0	0	0	20	20	16,7	0	6,7	0	0	0
Eclipse 100	LMR	96,7	96,7	0	100	100	100	100	100	0	0	0
	2 LMR	100	100	100	100	100	100	100	100	0	0	0
Eclipse 100	0,5 LMR	0	3,4	0	96,7	73,3	6,7	0	0	0	0	0
	LMR	96,7	66,7	0	100	100	100	100	56,7	0	0	0
2 LMR	100	100	100	100	100	100	100	100	0	0	96,7	

¹Delvotest MCS Accelerator

Se debe destacar que numerosos factores afectan a la sensibilidad de los métodos de cribado empleados para detectar residuos de antibióticos en leche. Así, la sensibilidad del BRT AiM depende de la calidad y la cantidad del microorganismo de prueba presentes en el medio. Müller y Jones (1993) y Nagel y col. (2009, 2010) destacan que una mayor concentración de microorganismos en el medio de cultivo produce una disminución en la sensibilidad, mientras que una disminución de esporas produce un aumento en la sensibilidad de los métodos.

Para otras especies, Althaus (1999) observó que el método BRT AiM presenta en la leche de oveja, como en este estudio, una sensibilidad del 100% para la amoxicilina, ampicilina, cloxacilina y penicilina, siendo menor para el ceftiofur (70%), aunque en el presente trabajo este método no fue capaz de detectar esta sustancia hasta 2 LMR.

De forma similar, Althaus y col. (2002) destacan que el Delvotest SP presenta una sensibilidad del 100% para la amoxicilina, ampicilina, cloxacilina, ceftiofur y penicilina G al LMR, resultados similares a los obtenidos en este estudio para la leche de vaca.

Montero y col. (2005) también estudiaron la sensibilidad del Eclipse 100 “ov” en muestras de leche de oveja, calculando los límites de detección de 27 agentes antimicrobianos diferentes. Los resultados obtenidos muestran que el método es adecuado para la detección de residuos de antibióticos betalactámicos a concentraciones equivalentes al LMR, pero no ofrece una buena sensibilidad para los antibióticos aminoglucósidos, macrólidos, tetraciclinas y quinolonas, ya que los límites establecidos son superiores a los límites legales.

Además, es muy importante resaltar que en el análisis de la dicloxacilina (Cuadro 21) todos los métodos ensayados detectan esta sustancia a una concentración de 15 µg/Kg (0,5 LMR), con porcentajes del 46,7% en el Delvotest MCS Accelerator y del 100% en el resto. En el caso de la penicilina G, BRT AiM, Blue Yellow, CMT Copan, Delvotest MCS Accelerator y Eclipse 100 también presentan una sensibilidad elevada a 0,5 LM (entre el 66,7% Blue Yellow y el 100% BRT AiM y Delvotest MCS Accelerator).

En este sentido, un método de cribado ideal debe proporcionar solamente respuestas positivas cuando los analitos están presentes a niveles lo más cercanos posibles a los valores de los Límites Máximos de Residuos establecidos por la legislación (Moats y col., 2000). De esta manera, las muestras que infrinjan los niveles legales pueden ser detectadas sin necesidad de realizar otros análisis posteriores

(Schneider y col., 2009) ya que resultan más costosos, tales como LC-MS-MS e innecesarios. Además, pueden ocasionar pérdidas económicas a las empresas lácteas, al rechazar muestras conformes desde el punto de vista de la legislación y aplicar sanciones injustas a productores (Schneider y Lehotay, 2008).

A este respecto, Riediker y col. (2001) señalan que el Delvotest SP muestra resultados positivos para muestras de leche que contienen residuos de cloxacilina y penicilina a niveles inferiores a sus LMRs, después de haber cuantificado sus concentraciones por técnicas LC-MS. Destacan además, que los métodos de cribado dan una respuesta positiva en caso que dos analitos estén presentes en una única muestra, cada uno de ellos a niveles inferiores a sus respectivos LMRs, puesto que estarían manifestando un efecto sinérgico en los métodos de cribado.

Para las cefalosporinas, con los métodos microbiológicos los valores de sensibilidad son más variados según la molécula ensayada (Cuadro 21). Así, en el estudio de la cefalexina, cefalonio y cefoperazona todos los métodos detectan estas sustancias al LMR. En cambio, para la cefquinoma solo el Blue Yellow es capaz de obtener resultados positivos al LMR (70% de resultados positivos) y el ceftiofur solo es detectado al LMR por el Blue Yellow y el Delvotest MCS Accelerator (100% de sensibilidad en ambos casos).

Para aquellos antibióticos que presentan diferencias de sensibilidad entre métodos, se realizó un análisis estadístico, a través de la regresión logística, que permite poner de manifiesto si las diferencias encontradas entre métodos son significativas.

En la Figura 29, se presenta de una forma gráfica la sensibilidad al LMR de los métodos microbiológicos para el estudio de las penicilinas, junto a la significación estadística obtenida para cada método y antibiótico. A partir de dicha Figura se observa que los métodos que presentan resultados estadísticamente distintos al resto son el Blue Yellow y el Delvotest SP-NT en el caso de la amoxicilina, Blue Yellow y Eclipse 100 para la ampicilina, las dos versiones de Eclipse (Eclipse 100 y Eclipse 50) para la cloxacilina, el Eclipse 100 en la dicloxacilina. Por último para la penicilina G, como ya se ha comentado anteriormente, todos los métodos microbiológicos presentan una sensibilidad del 100%

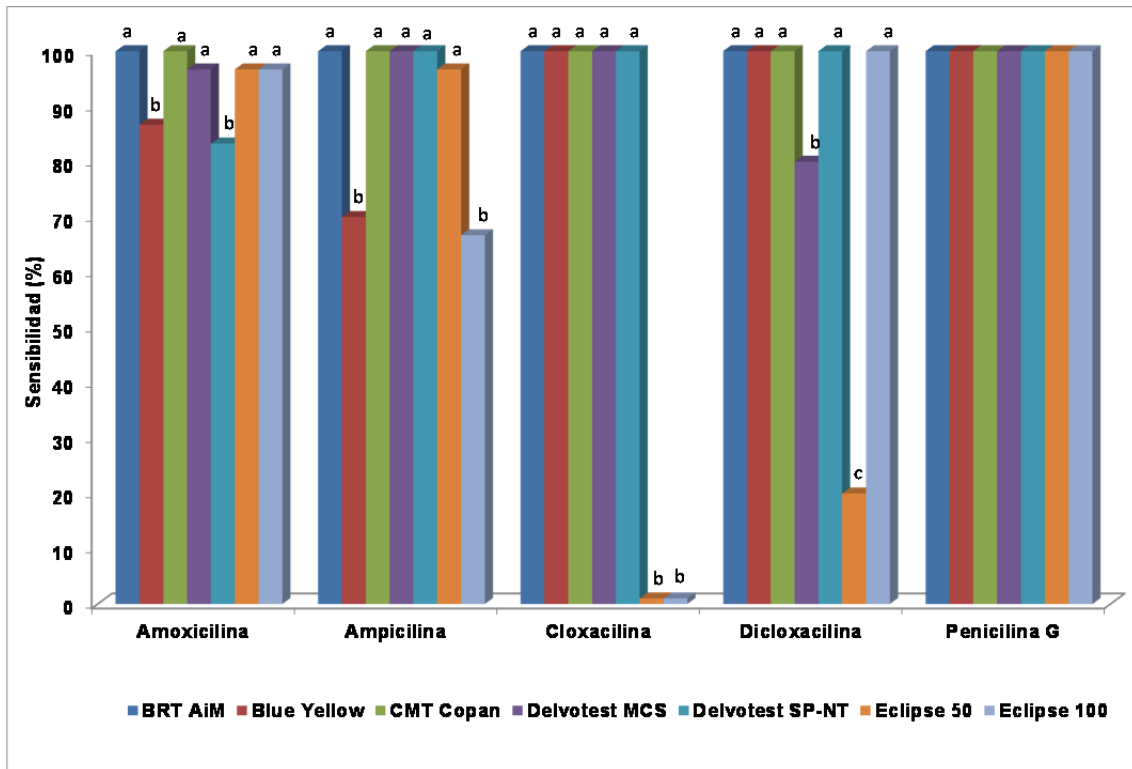


Figura 29. Sensibilidad de los métodos microbiológicos para las penicilinas al Límite Máximo de Residuos

a, b, c: Letras distintas indican diferencias estadísticas entre métodos ($p < 0,05$)

Para las cefalosporinas ensayadas (Figura 30), los métodos presentan, en general, una sensibilidad al LMR elevada para la cefalexina, cefalonio y cefoperazona, excepto los métodos Blue Yellow y Delvotest MCS Accelerator para la cefalexina, el Delvotest Accelerator en la detección de cefalonio y el Eclipse 100 en la cefoperazona.

Hay que destacar el caso de la cefquinoma (Figura 30) solo el Blue Yellow presenta sensibilidad a este antibiótico, por eso sus resultados son distintos estadísticamente al resto de métodos. Hecho que también se observa en el método Blue Yellow y el Delvotest MCS Accelerator para la detección de ceftiofur.

1.2.1.2. Métodos específicos (cualitativos de confirmación)

En el Cuadro 22 se presentan los valores de sensibilidad a 0,5 LMR, LMR y 2 LMR de los métodos específicos para los antibióticos betalactámicos. Para este grupo de antibióticos, los métodos específicos utilizados presentaron una sensibilidad muy variada según la molécula ensayada. De tal forma que al LMR hay métodos que detectan ciertas sustancias pero otras no. Debido a la variabilidad de los resultados obtenidos, se ha considerado interesante explicar estos resultados de forma individual para cada antibiótico.

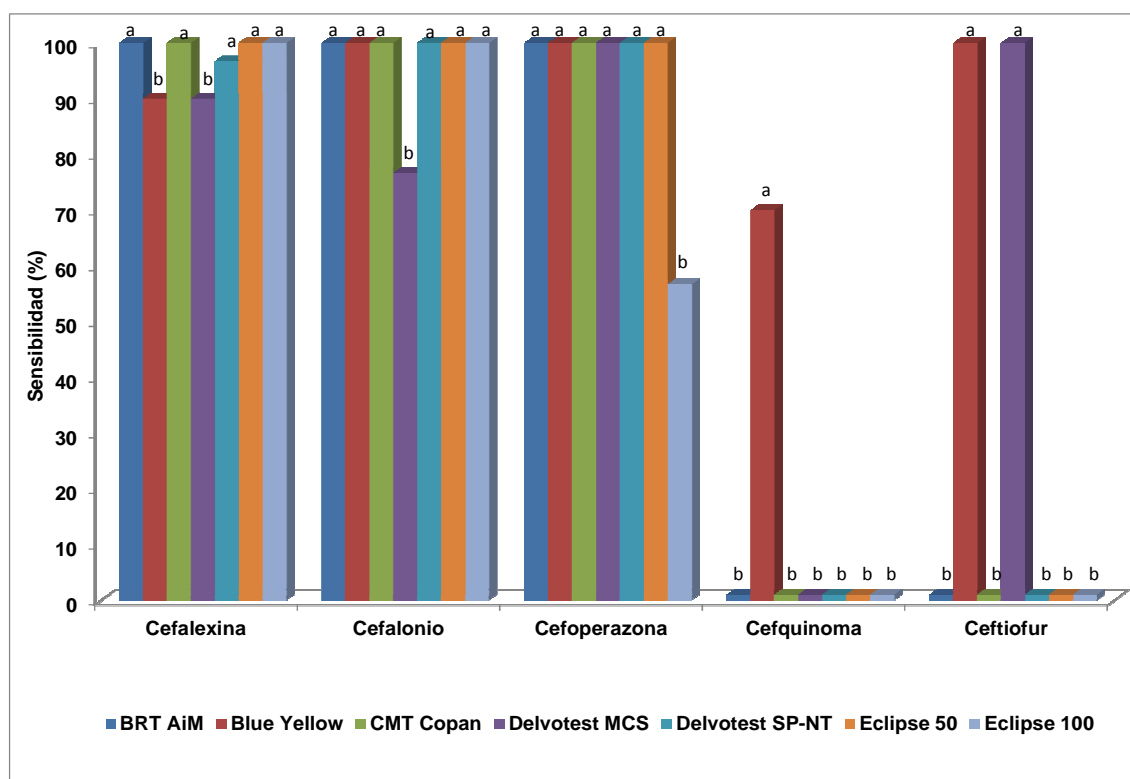


Figura 30. Sensibilidad de los métodos microbiológicos para las cefalosporinas al Límite Máximo de Residuos

a, b, c: letras distintas indican diferencias estadísticas entre métodos ($p < 0,05$)

Así, para la amoxicilina los métodos específicos se calculan valores de sensibilidad, a una concentración equivalente al LMR ($4 \mu\text{g}/\text{kg}$), elevado en el Beta Star (90%) intermedios para el Penzym, Rosa, Snap y Twinsensor (50-60%) y bajos el Delvo XP (20%).

En cambio en el Cuadro 22 se observa que a una concentración de ampicilina equivalente al LMR ($4 \mu\text{g}/\text{kg}$), en los métodos Penzym, Beta Star y Rosa la sensibilidad es del 100%. A su vez, el método Beta Star presenta una sensibilidad del 80% para la detección de ampicilina a la concentración de 0,5 LMR, lo que puede suponer que ya a esa concentración, la mitad de la legislada, se encuentren resultados positivos que pueden ocasionar la inmovilización de la leche y su posterior destrucción.

La sensibilidad para la ampicilina resulta muy baja en el Snap y Twinsensor (20%) y es necesaria una concentración de 2 LMR para detectar esta sustancia al 100%. También el Delvo XP muestra una sensibilidad muy baja para esta sustancia al LMR, incluso a una concentración superior al LMR (2 LMR).

Cuadro 22. Sensibilidad (%) de los métodos específicos para la detección de antibióticos betalactámicos

Método	Antibiótico (LMR: µg/Kg)										
	Nivel	Amoxicilina (4)	Ampicilina (4)	Cloxacilina (30)	Dicloxacilina (30)	Penicilina G (4)	Cefalexina (100)	Cefalonio (20)	Cefoperazona (50)	Cefquinoma (20)	Ceftiofur (100)
Penzym	0,5 LMR	0	10	0	0	10	100	60	20	0	0
	LMR	50	100	0	40	90	100	100	40	10	0
	2 LMR	70	100	80	60	100	100	100	100	100	0
Beta Star	0,5 LMR	0	80	100	100	50	0	100	100	100	0
	LMR	90	100	100	100	100	0	100	100	100	0
	2 LMR	100	100	100	100	100	0	100	100	100	0
Delvo XP	0,5 LMR	10	0	0	10	0	30	70	0	10	100
	LMR	20	0	10	20	60	60	80	80	30	100
	2 LMR	50	50	20	100	100	90	100	100	100	100
Rosa MRL BL	0,5 LMR	0	30	0	50	60	100	100	100	10	100
	LMR	60	100	0	100	100	100	100	100	100	100
	2 LMR	100	100	50	100	100	100	100	100	100	100
Snap BL	0,5 LMR	0	0	0	70	90	100	100	100	0	100
	LMR	60	20	40	100	100	100	100	100	100	100
	2 LMR	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Twinsensor	0,5 LMR	30	0	100	100	40	10	100	100	30	100
	LMR	50	20	100	100	80	30	100	100	90	100
	2 LMR	80	100	100	100	100	40	100	100	100	100

En el caso de la cloxacilina (Cuadro 22), Beta Star y Twinsensor presentan una sensibilidad del 100% a una concentración equivalente al LMR, que también se obtiene a 0,5 LMR. Por otro lado, en los métodos Delvo XP y Snap la sensibilidad es del 10 y 40% respectivamente para la cloxacilina al LMR, mientras que el Penzym y el Rosa no son capaces de detectarla (0%). Al aumentar la concentración de cloxacilina hasta 60 µg/kg (2 LMR), los métodos Penzym y Rosa mejoran su sensibilidad (80 y 50%, respectivamente).

Los valores de sensibilidad para la dicloxacilina con los métodos específicos (Cuadro 22), son similares a las calculadas con los métodos microbiológicos, ya que a una concentración de 30 µg/kg (LMR) todos los métodos presentan una sensibilidad del 100%, excepto el Penzym (40%) y el Delvo XP (20%). Además los métodos Beta Star y Twinsensor también muestran una sensibilidad del 100% para la detección de la dicloxacilina al 0,5 LMR.

Para la penicilina G, como se aprecia en el Cuadro 22, los métodos Beta Star, Rosa y Snap detectan esta sustancia al LMR con un porcentaje de sensibilidad del 100%, mientras que en el Penzym, Delvo XP y Twinsensor los valores son inferiores, 90, 60 y 80% respectivamente, que se elevan al 100% cuando se duplica la concentración de penicilina en la muestra de leche (2 LMR).

En cuanto al estudio de la sensibilidad para la cefalexina de los métodos específicos (Cuadro 22), los resultados obtenidos muestran que al LMR, únicamente en los métodos Penzym, Rosa y Snap se calcula una sensibilidad del 100%, y que además, ya consiguen esta sensibilidad a una concentración de 0,5 LMR. Por otro lado, los métodos Delvo XP y Twinsensor presentan una sensibilidad baja al LMR, con valores del 60 y 30%, respectivamente. Cuando se aumenta la concentración de cefalexina a 2 LMR, el Delvo XP mejora la sensibilidad llegando hasta el 90%, en cambio en el Twinsensor su sensibilidad mejora solo levemente (40%). El Beta Star por su parte, no detecta la cefalexina a ninguna de las concentraciones ensayadas.

En el Cuadro 22 se aprecia que todos los métodos son capaces de detectar el cefalonio a la concentración de su LMR con una sensibilidad del 100%, excepto el Delvo XP que presenta un porcentaje del 80%. Además estos métodos muestran también sensibilidad muy elevada en el estudio del cefalonio a 0,5 veces su LMR, con porcentajes comprendidos entre el 60 y 100%.

En el cálculo de la sensibilidad para la cefoperazona el Beta Star, Rosa, Snap y Twinsensor esta resulta del 100%, y para una concentración de 25 µg/Kg equivalente al 0,5 LMR (Cuadro 22). Esto indica que estos métodos presentan límites de detección

por debajo del LMR y que señalan resultados “positivos” en muestras de leche dentro del marco legal establecido por la UE. Por otro lado, en los métodos Penzym y Delvo XP al LMR la sensibilidad es inferior, 40 y 80% respectivamente.

Al analizar la cefquinoma al LMR, mediante los métodos Beta Star, Rosa y Snap se calcula una sensibilidad del 100%. El Twinsensor también presenta una elevada sensibilidad del 90%, mientras que para el Penzym y el Delvo XP resulta baja (10 y 30%, respectivamente).

En cuanto a la detección del ceftiofur a 0,5 LMR, LMR y 2 LMR (Cuadro 22), todos los métodos específicos a betalactámicos son capaces de detectar esta cefalosporina a 0,5 LMR, menos el Penzym y el Beta Star que incluso a 2 LMR no tienen sensibilidad alguna (0%).

Otros autores también han estudiado la sensibilidad del Penzym y señalan que se trata de un método muy específico que permite detectar concentraciones pequeñas (5 µg/Kg) de amoxicilina, ampicilina, cefapirina y penicilina (Charm y Ruth, 1993; Senyk y col., 1990; Suhren y col., 1996; Sischo, 1996) y un rango de 3-18 µg/Kg para la ampicilina (Senyk y col., 1990; Suhren y col., 1996; Hozová y Kratmüllerová, 2001). No obstante, otros autores presentan límites de detección mayores como por ejemplo la cloxacilina que debe estar presente en concentraciones entre el 40-80 µg/Kg (Jaskch, 1988), 55 µg/Kg (Suhren y col., 1996) o 80-120 µg/Kg (Senyk y col., 1990) para ser detectada.

Recientemente, Reybroeck y col. (2010) en la validación del Beta Star estudiaron entre otros parámetros, su sensibilidad. Los resultados muestran que este método es capaz de detectar todos los betalactámicos al Límite Máximo de Residuos, excepto la cefalexina (capacidad de detección = 6000 µg/kg; LMR = 100 µg/Kg) y penetamato (capacidad de detección = 80 µg/kg; LMR = 4 µg/Kg) y el ceftiofur sólo a partir de 500 µg/kg (LMR = 100 µg/Kg). Estos resultados coinciden con los obtenidos en este estudio en el caso de la cefalexina, ya que el Beta Star no es capaz de detectar esta sustancia al LMR. Este hecho también ocurre con el ceftiofur, pero el resto de antibióticos betalactámicos ensayados son detectados al LMR.

Por otra parte, Suhren y Knappstein (2004) y Žirdauskienė y Šalomskienė (2007), concluyeron que el Beta Star, es un buen método para detectar penicilina G, amoxicilina, ampicilina y nafcilina a concentraciones inferiores a los LMRs, y además es el único capaz de detectar la cefquinoma por debajo del nivel legal.

En leche de otras especies Roca y col. (2007) calcularon para el Rosa MRL BL, una sensibilidad elevada al LMR (90-100%) para el ceftiofur, la cefalexina y la cefoperazona, un poco inferior aunque también elevada para la ampicilina (83%) y menor al 60% para la penicilina y la cloxacilina. En cuanto al Snap BL, la sensibilidad para los betalactámicos resultó más elevada, llegando al 100% para el ceftiofur, la cefalexina y cefoperazona, y al 80% para la penicilina y la cloxacilina. Respecto al método Twinsensor la sensibilidad fue muy elevada para todos los betalactámicos estudiados, excepto para la cefalexina que presentó valores ligeramente superiores al 50%.

Para estudiar las diferencias obtenidas para un mismo antibiótico analizado con los distintos métodos específicos se realizó un análisis estadístico mediante la regresión logística. En el caso de las penicilinas los resultados se presentan en la Figura 31.

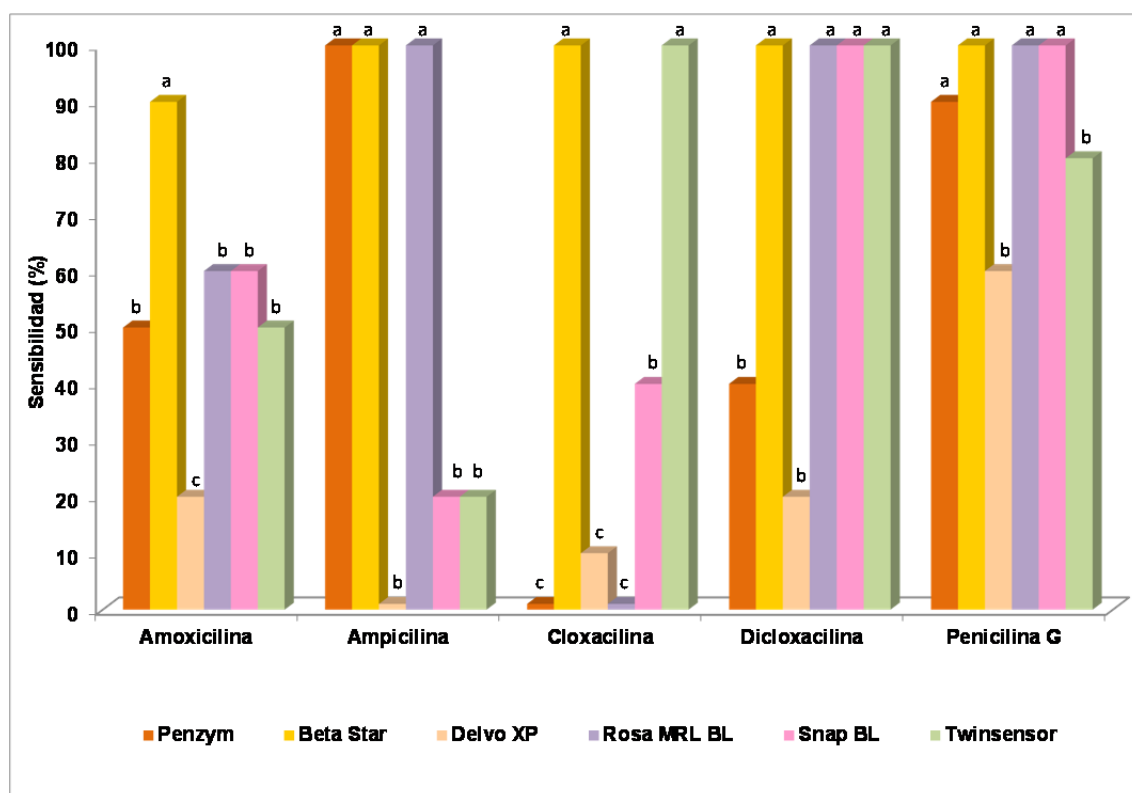


Figura 31. Sensibilidad de los métodos específicos para las penicilinas al Límite Máximo de Residuos

a, b, c: letras distintas indican diferencias estadísticas entre métodos ($p < 0,05$)

Como se ha comentado anteriormente, los métodos específicos presentan valores de sensibilidad variados según la molécula y el método considerado, por ello tal y como se observa en la Figura 31 desde un punto de vista estadístico existen

diferencias entre los resultados de los distintos métodos empleados, siendo en las moléculas ampicilina y cloxacilina donde se presentan mayores diferencias entre métodos.

Respecto a las cefalosporinas, en la Figura 32, se exponen los valores de sensibilidad de los métodos específicos junto a los resultados del análisis estadístico, donde puede deducirse que los métodos específicos muestran sensibilidades diferentes, sobre todo en el análisis de la cefalexina, cefquinoma y ceftiofur, aunque son menores a las encontradas para las penicilinas

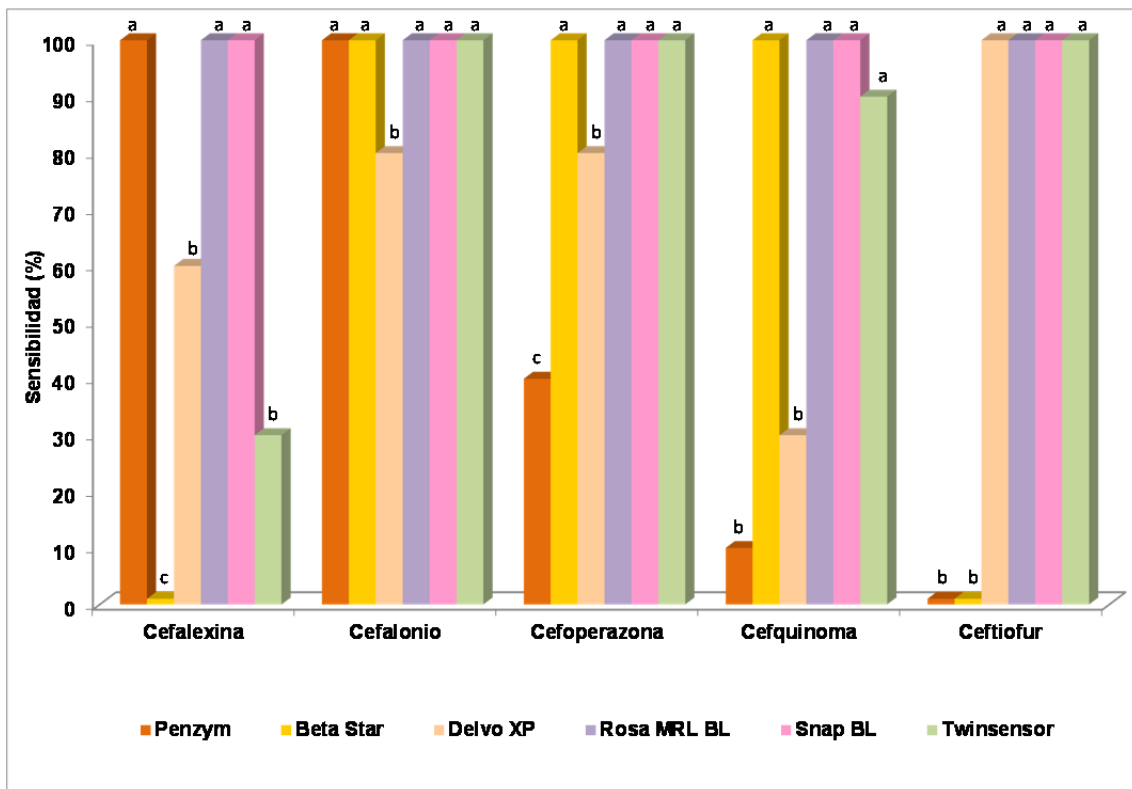


Figura 32. Sensibilidad de los métodos específicos para las cefalosporinas al Límite Máximo de Residuos

a, b, c: letras distintas indican diferencias estadísticas entre métodos ($p < 0,05$)

1.2.2. Otros antibióticos no betalactámicos

También se consideró interesante realizar el análisis de otras sustancias antimicrobianas debido a su amplio uso en el tratamiento de enfermedades infecciosas del ganado vacuno lechero. Todas las sustancias fueron ensayadas por los métodos microbiológicos ya que para la mayor parte de estas sustancias no existen métodos específicos comercializados, solamente en el caso de la oxitetraciclina, gentamicina y de la enrofloxacin.

1.2.2.1. Métodos microbiológicos

➤ Neomicina y tilosina

En el Cuadro 23 se presentan los porcentajes de sensibilidad obtenidos en los métodos microbiológicos para la neomicina y la tilosina a concentraciones de 0,5 LMR, LMR y 2 LMR ya que los límites de detección de los métodos utilizados son cercanos o ligeramente superiores a los LMR. En el caso de la neomicina, los métodos BRT AiM, Blue Yellow y Delvotest SP-NT detectan al LMR esta sustancia con una sensibilidad del 100%. A esta misma concentración la sensibilidad del Delvotest MCS Accelerator es del 50%. El resto de métodos ensayados muestran poca o ninguna sensibilidad hasta que la neomicina no está presente a 3.000 µg/Kg (2 LMR).

Cuadro 23. Sensibilidad (%) de los métodos microbiológicos para la detección de antibióticos no betalactámicos (neomicina y tilosina)

Método	Antibiótico (LMR: µg/Kg)		
	Nivel	Neomicina (1.500)	Tilosina (50)
BRT AiM	0,5 LMR	3,4	0
	LMR	100	0
	2 LMR	100	100
Blue Yellow	0,5 LMR	3,4	0
	LMR	100	0
	2 LMR	100	100
CMT Copan	0,5 LMR	0	0
	LMR	10	100
	2 LMR	100	100
Delvotest MCS ¹	0,5 LMR	0	100
	LMR	50	100
	2 LMR	100	100
Delvotest SP-NT	0,5 LMR	3,4	0
	LMR	100	100
	2 LMR	100	100
Eclipse 50	0,5 LMR	0	0
	LMR	0	0
	2 LMR	100	0
Eclipse 100	0,5 LMR	0	0
	LMR	0	0
	2 LMR	100	100

¹Delvotest MCS Accelerator

En el estudio de la tilosina solamente en CMT Copan, Delvotest MCS Accelerator y Delvotest SP-NT se calcula una sensibilidad del 100% a concentraciones equivalentes al LMR. Los métodos Blue Yellow y el Eclipse 100 necesitan una concentración de 2 LMR para presentar un 100% de resultados positivos, y por último el Eclipse 50 no presenta sensibilidad alguna para esta sustancia a ninguna de las concentraciones ensayadas.

El análisis estadístico para señalar las diferencias entre los métodos microbiológicos en el estudio de la neomicina y la tilosina al LMR (Figura 33) muestra en el caso de la neomicina, debido a que los métodos Blue Yellow, Delvotest MCS Accelerator y Delvotest SP-NT obtienen al Límite Máximo de Residuos un 100% de resultados positivos y el BRT AiM, CMT Copan, Eclipse 50 y Eclipse 100 una sensibilidad nula (0%), un efecto significativo. Para la tilosina las diferencias significativas en los porcentajes de sensibilidad se obtienen en los métodos CMT Copan, Delvotest MCS Accelerator, Eclipse 50 y Eclipse 100 respecto a los otros métodos microbiológicos ensayados.

➤ Otros antibióticos

El resto de sustancias ensayadas (oxitetraciclina, estreptomina, gentamicina, kanamicina, eritromicina, lincomicina, colistina y enrofloxacina) se ensayaron a concentraciones equivalentes al LMR, 2 LMR y 4 LMR, ya que las casas fabricantes indican en algunos casos límites de detección superiores al LMR o incluso no presentan ningún valor debido a la baja sensibilidad del microorganismo de prueba *G. stearothermophilus* para estas sustancias.

Los resultados obtenidos en el estudio de las citadas sustancias se presentan en el Cuadro 24 donde se observa que para la gentamicina, eritromicina y lincomicina los métodos no presentan ninguna sensibilidad al LMR aunque si son capaces de presentar resultados positivos a concentraciones de 2 y 4 LMR, por el contrario no son capaces de detectar la estreptomina, kanamicina y enrofloxacina a ninguna de las concentraciones ensayadas.

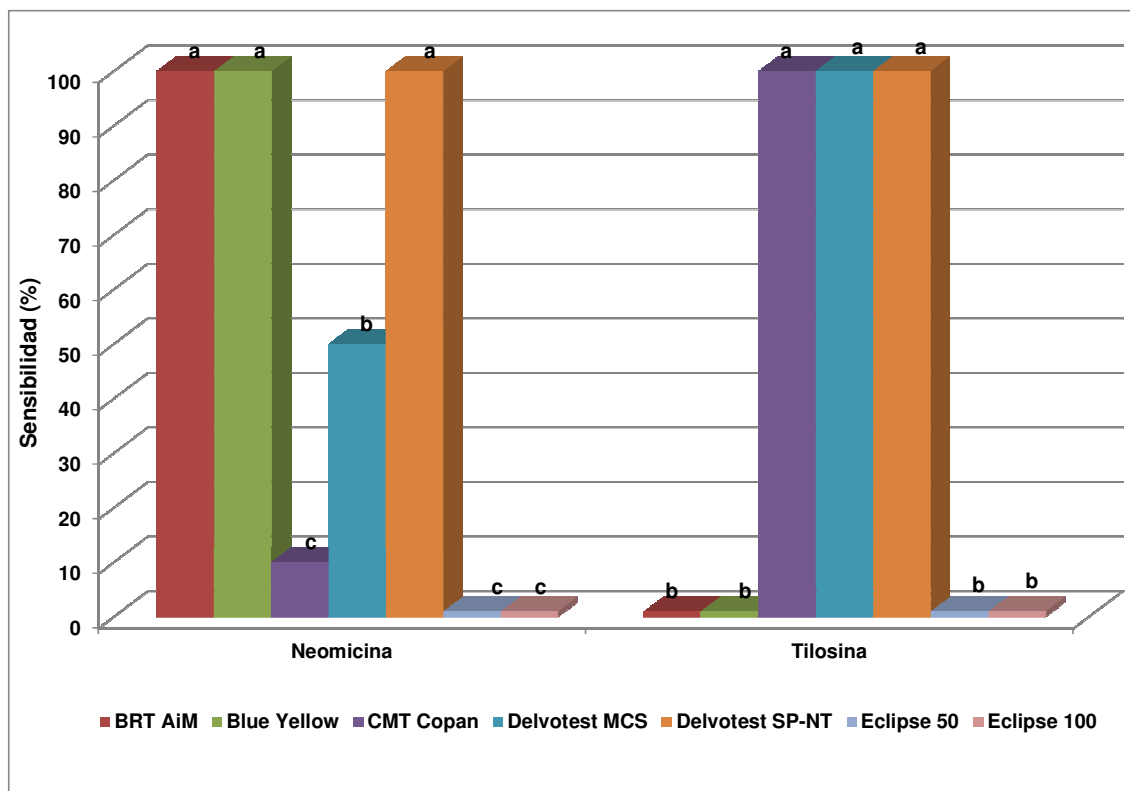


Figura 33. Sensibilidad de los métodos específicos para la neomicina y la tilosina al Límite Máximo de Residuos

a, b, c: letras distintas indican diferencias estadísticas entre métodos ($p < 0,05$)

En el caso de la oxitetraciclina el Blue Yellow es el único método capaz de detectar su presencia a una concentración igual al LMR con un porcentaje de sensibilidad del 53,3%, pero si se aumenta la concentración hasta 200 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ (2 LMR) los métodos BRT, Delvotest Accelerator y Blue Yellow mejoran su sensibilidad a esta sustancia con porcentajes del 13,3%, 56,7% y 100% respectivamente. El resto de métodos no detectan la oxitetraciclina a esta concentración. Si aumentamos la concentración de la oxitetraciclina hasta 4 LMR, todos los métodos alcanzan una sensibilidad del 100%, excepto el BRT. Estos resultados indican que la mayoría de los métodos microbiológicos no son adecuados para la detección de oxitetraciclina al nivel legal lo que implica que un sistema de detección basado exclusivamente en el empleo de métodos microbiológicos de cribado no garantiza el control de tetraciclinas pudiendo llegar sus residuos en la leche a la industria láctea y al consumidor.

Cuadro 24. Sensibilidad (%) de los métodos microbiológicos para la detección de antibióticos no betalactámicos

Método	Antibiótico (LMR: µg/Kg)									
	Nivel	Estreptomina (200 µg/Kg)	Gentamicina (100 µg/Kg)	Kanamicina (150 µg/Kg)	Eritromicina (40 µg/Kg)	Lincomicina (150 µg/Kg)	Colistina (50 µg/Kg)	Enrofloxacin (100 µg/Kg)	Oxitetraciclina (100 µg/Kg)	
BRT AiM	LMR	0	0	0	0	0	0	0	0	
	2 LMR	0	0	0	86,7	0	0	0	13,3	
	4 LMR	0	100	0	100	100	0	0	20	
Blue Yellow	LMR	0	0	0	100	0	0	0	53,3	
	2 LMR	0	100	0	100	0	0	0	100	
	4 LMR	0	100	0	100	100	0	0	100	
CMT Copan	LMR	0	0	0	0	0	0	0	0	
	2 LMR	0	0	0	6,7	0	0	0	0	
	4 LMR	0	100	0	20	100	0	0	100	
Delvotest MCS	LMR	0	0	0	0	0	0	0	0	
	2 LMR	0	16	0	3,3	0	0	0	56,7	
	4 LMR	90	100	50	16,7	100	26,7	0	100	
Delvotest SP-NT	LMR	0	0	0	0	0	0	0	0	
	2 LMR	0	100	0	100	0	0	0	0	
	4 LMR	0	100	0	100	93,4	0	0	100	
Eclipse 50	LMR	0	0	0	0	0	0	0	0	
	2 LMR	0	73,4	0	0	0	0	0	0	
	4 LMR	0	100	0	0	0	0	0	100	
Eclipse 100	LMR	0	0	0	0	0	0	0	0	
	2 LMR	0	3,4	0	0	0	0	0	100	
	4 LMR	0	100	0	0	0	0	0	100	

1.2.2.2. Métodos específicos (cualitativos de confirmación)

➤ Oxitetraciclina

En el Cuadro 25 se resumen los resultados del cálculo de la sensibilidad de los métodos específicos para la detección de tetraciclinas que se estudiaron a 0,5 LMR, LMR y 2 LMR, ya que los límites de detección calculados por los fabricantes son mucho más bajos que los límites de detección de los métodos microbiológicos.

De los resultados del Cuadro 25, se deduce que los tres métodos Rosa MRL TET, Snap TET y Twinsensor TET presentan una elevada sensibilidad para la oxitetraciclina a una concentración equivalente al LMR (100 µg/Kg). Por ello, estos métodos podrían ser una buena alternativa para combinar con los métodos microbiológicos en los controles de detección de antibióticos en la leche, ya que como se ha comentado anteriormente no presentan ninguna sensibilidad al LMR para la oxitetraciclina.

Hay que tener en cuenta, que tanto el Rosa MRL TET como el Snap TET la sensibilidad es del 100% a 0,5 LMR. La elevada sensibilidad de estos métodos puede suponer un problema en el control de la presencia de residuos en la etapa de cribado, ya que se puede determinar que una muestra sea no conforme cuando realmente está por debajo del LMR establecido por la legislación.

Cuadro 25. Sensibilidad (%) de los métodos específicos para la detección de oxitetraciclina

Oxitetraciclina	Sensibilidad (%)		
	0,5 LMR (50 µg/Kg)	LMR (100 µg/Kg)	2 LMR (200 µg/Kg)
Rosa MRL TET	100	100	100
Snap TET	100	100	100
Twinsensor TET	0	100	100

La estrategia analítica establecida en el Real Decreto 1728/2007 señala que los métodos utilizados para la detección de antibióticos en la leche deberán ser capaces de detectar al menos la amoxicilina y ampicilina, entre los betalactámicos y la oxitetraciclina entre las tetraciclinas, tanto para las pruebas realizadas en la explotación como en los centros lácteos. Por ello, la utilización de estos métodos específicos para la detección de oxitetraciclina parece ser correcta. En cambio como se ha comentado anteriormente, los métodos microbiológicos no presentan buena sensibilidad para esta sustancia.

Este hecho puede dar lugar a resultados contradictorios, ya que los métodos específicos se utilizan en la práctica en las pruebas de detección *in situ* realizadas en las explotaciones y centros lácteos porque permiten obtener resultados en un corto periodo de tiempo (5-15 min.) mientras que los métodos microbiológicos son más utilizados en los laboratorios de control debido a que permiten el análisis de muchas muestras simultáneamente, son de fácil uso y su coste es menos elevado. Por ello, el diferente patrón o perfil de sensibilidad entre métodos con diferente base analítica puede ser un problema.

➤ Enrofloxacin y gentamicina

En aquellos casos en los que se podían emplear métodos específicos, como la enrofloxacin y la gentamicina se prepararon muestras de leche con 0,25 LMR, 0,5 LMR y al LMR para el caso de los métodos Rosa Enroflox y Snap Gentamicin. Por otro lado, para el Equinox se ensayó la enrofloxacin a 1, 2 y 2,5 LMR debido al límite de detección marcado por el fabricante para este método (200 µg/Kg). Los resultados de estos análisis se presentan en el Cuadro 26.

Como se aprecia en el citado Cuadro, el Rosa Enroflox se calcula para la enrofloxacin una sensibilidad del 100% al LMR y el Equinox del 93,3%. Hay que señalar que el Rosa Enroflox ya presenta esta sensibilidad al 0,25 LMR.

A su vez, el Snap Gentamicin muestra una sensibilidad del 100% para la gentamicina al LMR incluso con una concentración correspondiente a 0,25 LMR.

Cuadro 26. Sensibilidad (%) de los métodos específicos para la detección de enrofloxacin y gentamicina

Sensibilidad (%)			
Enrofloxacin	0,25 LMR (25 µg/Kg)	0,5 LMR (50 µg/Kg)	LMR (100 µg/Kg)
Rosa Enroflox	100	100	100
Enrofloxacin	LMR (100 µg/Kg)	2 LMR (200 µg/Kg)	2,5 LMR (250 µg/Kg)
Equinox	93,3	96,7	100
Gentamicina	0,25 LMR (25 µg/Kg)	0,5 LMR (50 µg/Kg)	LMR (100 µg/Kg)
Snap Gentamicin	100	100	100

Debido a la nula sensibilidad de los métodos microbiológicos para la detección de otros antibióticos no betalactámicos y por otro lado a la elevada sensibilidad obtenida al Límite Máximo de Residuos en los métodos específicos para tetraciclinas,

enrofloxacin y gentamicina no se realizó el análisis estadístico ya que no es posible realizar la comparación de los resultados obtenidos.

1.3. Comparación de la sensibilidad de los métodos con el Límite Máximo de Residuos (LMR) de antibióticos en la leche

A modo de resumen y para poder comparar gráficamente los diferentes porcentajes de sensibilidad obtenidos, se han elaborado las Figuras 34, 35 y 36, con el propósito de realizar la comparación de la sensibilidad al LMR obtenida para cada antibiótico en cada uno de los métodos microbiológicos o específicos empleados. En dichas Figuras, se representan las concentraciones para las cuales cada antibiótico ha presentado el 100% de resultados positivos.

1.3.1. Antibióticos betalactámicos

1.3.1.1. Métodos microbiológicos

En la Figura 34 se representan los resultados de los diferentes métodos microbiológicos para los antibióticos betalactámicos.

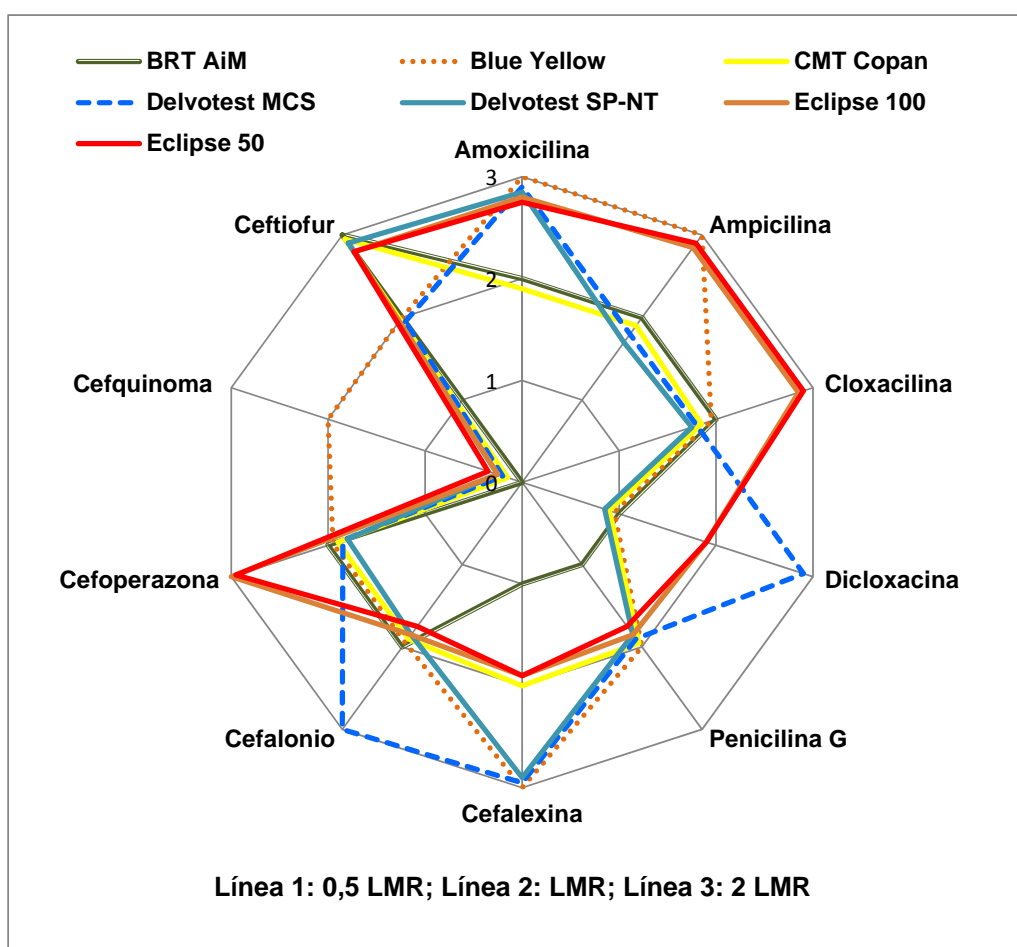


Figura 34. Comparación de la sensibilidad de los métodos microbiológicos en la detección de penicilinas

1.3.1.2. Métodos específicos (cualitativos de confirmación)

Los métodos específicos para antibióticos betalactámicos presentan respuestas más variadas según la molécula ensayada (Figura 35). En este caso los métodos que permiten detectar antibióticos betalactámicos a concentraciones más cercanas a los límites exigidos por la legislación (LMR) son el Beta Star, Rosa MRL BL y el Snap BL, en especial para las cefalosporinas.

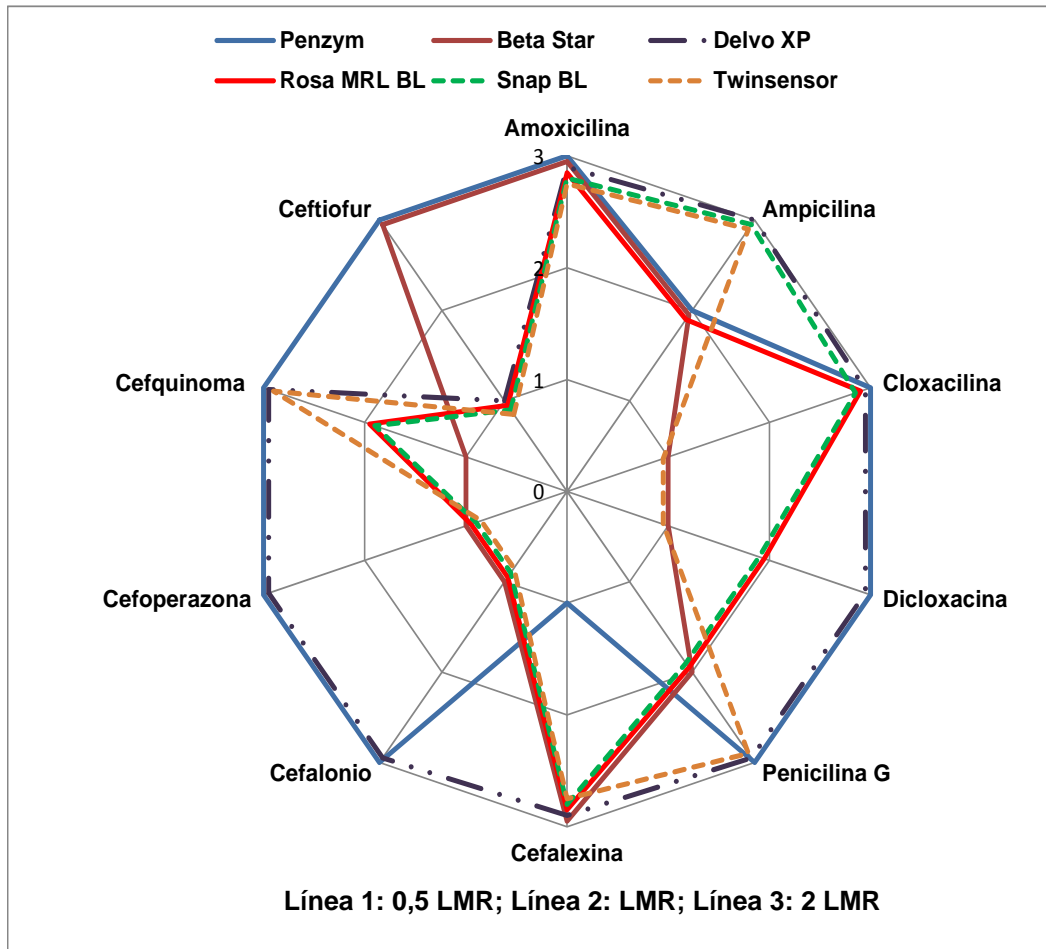


Figura 35. Comparación de la sensibilidad de los métodos específicos en la detección de cefalosporinas

Se puede concluir, que sería interesante incluir los dos tipos de métodos dentro de la estrategia de control de la presencia de betalactámicos, empleando métodos microbiológicos para la detección de penicilinas y métodos específicos para las cefalosporinas.

1.3.2. Otros antibióticos no betalactámicos

Para el resto de antibióticos no betalactámicos estudiados se ha elaborado la Figura 36. En este caso se han excluido los resultados obtenidos para la estreptomina, kanamicina, colistina y enrofloxacina, ya que ninguno de los métodos microbiológicos de cribado empleados son capaces de detectar estas sustancias, incluso a concentraciones elevadas (4 LMR).

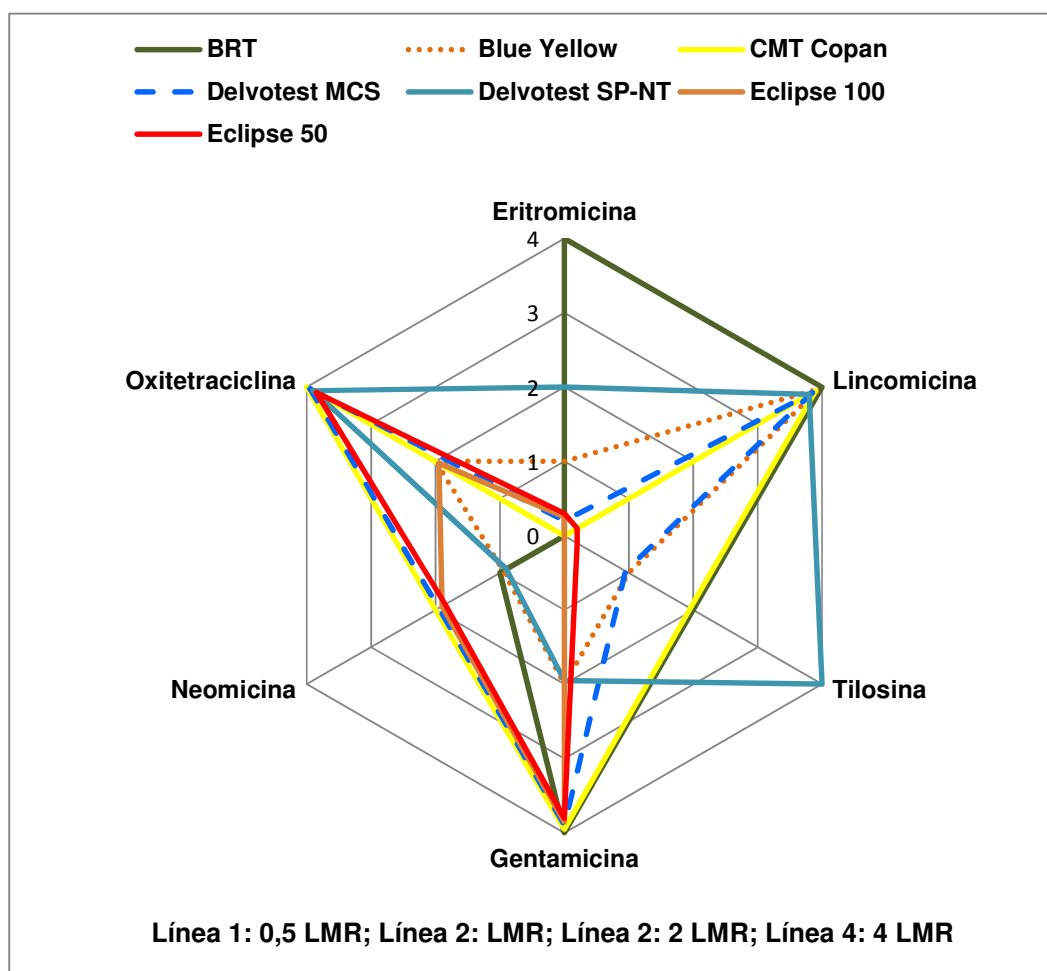


Figura 36. Comparación de la sensibilidad de los métodos microbiológicos en la detección de otros antibióticos no betalactámicos

Este hecho se debe a que los métodos microbiológicos utilizados se basan en la inhibición del *G. stearothermophilus* que presenta una elevada sensibilidad para los antibióticos betalactámicos, principalmente la penicilina, siendo mucho menos sensible a otras sustancias como aminoglucósidos, macrólidos, sulfonamidas, tetraciclinas o cloranfenicol (Katz y Siewierski, 1995; Botsoglou y Fletouris 2001; Navrátilová, 2008; Kantiani y col., 2009).

Para el resto de antibióticos ensayados, los métodos microbiológicos que permiten detectar el máximo número de antibióticos no betalactámicos al LMR son el Blue Yellow y el Delvotest SP-NT (Figura 36).

A la vista de estos primeros resultados se puede concluir, que los métodos microbiológicos que permiten detectar un mayor número de antibióticos en la leche son el Blue Yellow, CMT Copan, Delvotest SP-NT y Delvotest MCS Accelerator. Entre los métodos específicos destacan el Beta Star, Rosa MRL BL y Snap BL. De todos modos, en el segundo trabajo se profundiza en el estudio de los porcentajes de cobertura para cada uno de los métodos de cribado ensayados, con el fin de establecer posibles combinaciones entre métodos que permitan un mayor perfil de detección de antibióticos.

2. SEGUNDO ESTUDIO: Estrategia analítica para la detección de residuos de antimicrobianos en la leche de vaca

2.1. Análisis estadístico mediante la técnica de Análisis Multivariante de Conglomerados (Cluster)

2.1.1. Análisis cluster para las moléculas de antibióticos

Haciendo uso de los porcentajes de sensibilidad al LMR para cada uno de los métodos presentados en el primer estudio para cada uno de los métodos de cribado (Cuadros 21, 22, 23, 24, 25 y 26), se utilizó un análisis de conglomerados para establecer asociaciones entre moléculas de antibióticos y poder agruparlas según la capacidad de detección de los diferentes métodos de cribado (Análisis tipo Q).

El Cuadro 27 muestra los resultados del procedimiento de aglomeración de los diferentes agentes antimicrobianos considerados en este estudio, para los métodos de cribado utilizados, en donde se observa la formación de dos grupos o cluster (A y B).

En el cluster A, se agrupan en una primera etapa la estreptomicina, kanamicina, lincomicina y colistina a una distancia nula, puesto que ningún método llega a detectarlas. En una etapa posterior, al cluster "A" se incorpora la tilosina (7,829) y la eritromicina (11,797), moléculas que pueden ser detectadas por algunos métodos microbiológicos como Blue Yellow, Delvotest SP-NT y Accelerator. Finalmente se incorporan a este cluster las moléculas de eritromicina, gentamicina, enrofloxacina y oxitetraciclina que son detectadas por métodos específicos.

Cuadro 27. Resultados del procedimiento de aglomeración de las sustancias antimicrobianas según los diferentes métodos ensayados

Etapa	Antibiótico	Antibiótico	Cluster	Distancia ¹
1	Estreptomina	Kanamicina	A	0
2	Estreptomina	Lincomicina	A	0
3	Estreptomina	Colistina	A	0
8	Estreptomina	Tilosina	A	7,829
9	Estreptomina	Eritromicina	A	11,797
15	Estreptomina	Gentamicina	A	71,187
17	Estreptomina	Enrofloxacina	A	125,704
18	Estreptomina	Oxitetraciclina	A	167,006
4	Penicilina	Cefalonio	B	0,386
5	Penicilina	Cefoperazona	B	1,068
6	Amoxicilina	Ampicilina	B	2,431
7	Penicilina	Dicloxacilina	B	4,479
10	Penicilina	Cefalexina	B	4,473
11	Cefquinoma	Ceftiofur	B	22,964
12	Cloxacilina	Neomicina	B	23,889
13	Penicilina	Dicloxacilina	B	37,623
14	Penicilina	Cefquinoma	B	53,805
14	Penicilina	Cloxacilina	B	90,189

¹Distancia cuadrática Euclídea

Por su parte, penicilina, cefalexina, cefalonio, cefoperazona y dicloxacilina se integran a bajas distancias para formar el segundo grupo (cluster B) y después se incorporan las moléculas de amoxicilina y ampicilina. Las moléculas de cefquinoma y ceftiofur (22,964), al igual que cloxacilina y neomicina (23,889) se agrupan para incorporarse posteriormente al cluster B.

Con el propósito de visualizar la formación de los conglomerados en la Figura 37 se expone el dendograma obtenido del análisis, donde se observa el cluster "A" formado por estreptomina, kanamicina, lincomicina, colistina (a muy bajas distancias por no ser detectadas) y tilosina, eritromicina, gentamicina, enrofloxacina y oxitetraciclina a mayores distancias. En forma similar se aprecia el cluster "B" (penicilina, cefalonio, cefoperazona, dicloxacilina, cefquinoma, ceftiofur, cefalexina, amoxicilina, ampicilina, cloxacilina, neomicina).

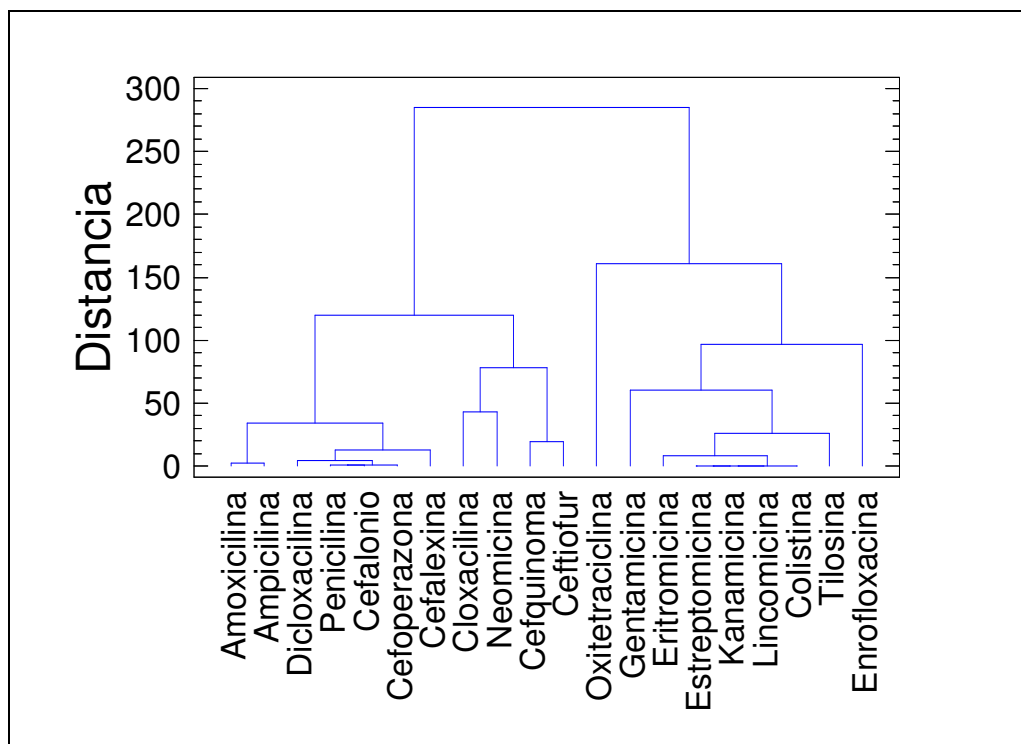


Figura 37. Dendrograma del análisis cluster basado en la sensibilidad de los antibióticos según los diferentes métodos ensayados

Del presente análisis estadístico se concluye que, las moléculas de estreptomicina, kanamicina, lincomicina y colistina deben ser eliminadas del análisis cluster (Análisis tipo Q) puesto que ninguna de estos antibióticos son detectadas a un nivel equivalente a sus Límites Máximos de Residuos por los métodos de cribado. Es conveniente señalar que, la eliminación de estos antibióticos en el posterior análisis por conglomerados tipo R presenta la ventaja de permitir asociar a los métodos según aquellos antibióticos que son capaces de detectar, sin embargo, implica una pérdida en el espectro de antibióticos a detectar, ya que la eliminación de estos antibióticos representa una disminución del 15,46% del total de antibióticos que se han considerado como los más empleados para el tratamiento del ganado vacuno productor de leche.

A este respecto, se debe destacar que algunos aminoglucósidos no podrán ser detectados por falta de un método con sensibilidad adecuada para estas moléculas (estreptomicina y kanamicina), a pesar de presentar una frecuencia de uso considerable en los tratamientos del ganado vacuno (6,91% y 4,23%, respectivamente) según las encuestas realizadas por Zorraquino y col. (2007) para el tratamiento de la mamitis y Zorraquino (2008) en la terapéutica de otras enfermedades infecciosas diferentes a las mamitis.

2.1.2. Análisis cluster para los métodos de cribado

En una segunda etapa, para los antibióticos que son detectados por los métodos de cribado, se aplicó el análisis de conglomerados, pero esta vez, a los métodos de cribado (Análisis tipo R) según los resultados de sensibilidad de cada uno de ellos para los diferentes antibióticos que pueden detectar, excepto el método Penzym que ha sido excluido del análisis debido al elevado porcentaje de “falsos positivos” obtenidos (17%). El procedimiento de formación de los cluster mediante la técnica de Ward y el uso de la distancia cuadrática Euclídea a las cuales se integran los diferentes métodos se muestran en el Cuadro 28.

En el Cuadro 28, se observa que los cluster se organizaron en tres grupos: A (métodos específicos para la detección de betalactámicos), B (métodos microbiológicos) y C (métodos específicos para otros antibióticos como oxitetraciclina, gentamicina y enrofloxacin).

El dendograma correspondiente a las distancias de formación de los conglomerados se expone en la Figura 38, donde se pueden observar los tres grupos detallados anteriormente. El primer cluster está constituido por los métodos específicos para los antibióticos betalactámicos (Rosa MRL BL, Snap BL, Beta Star, Twisensor BL y Delvo XP).

Cuadro 28. Resultados del procedimiento de aglomeración de los métodos de cribado según los resultados de sensibilidad a los LMRs

Etapa	Método	Método	Cluster	Distancia
5	Rosa MRL BL	Snap BL	A	2,460
6	Beta Star	Twisensor BL	A	4,213
8	Rosa MRL BT	Delvo XP	A	11,187
11	Beta Star	Rosa MRL BL	A	28,007
4	CMT Copan	Delvotest MCS	B	0,809
7	BRT AiM	Eclipse 50	B	7,548
9	BRT AiM	Delvotest SP-NT	B	15,052
10	Blue Yellow	Eclipse 100	B	20,607
12	BRT AiM	CMT Copan	B	35,446
13	BRT AiM	Blue Yellow	B	46,277
1	Equinox	Rosa Enroflox	C	0
2	Rosa TET	Snap TET	C	0
3	Rosa TET	Twisensor TET	C	0
14	Equinox	Snap Gentamicin	C	67,580
15	Equinox	Rosa TET	C	90,412

El segundo grupo (cluster B) está formado por los métodos microbiológicos (BRT AiM, Blue Yellow, CMT Copan, Delvotest SP-NT, Delvotest MCS Accelerator, Eclipse 50 y Eclipse 100) que, además de presentar buena sensibilidad para los betalactámicos, algunos de ellos poseen sensibilidad para otras moléculas tales como tilosina, neomicina y eritromicina ya que utilizan como microorganismo de prueba a *Geobacillus stearothermophilus*, y poseen cierta similitud tanto en los antibióticos que pueden detectar como en sus límites de detección. Por último, el cluster C lo integran aquellos métodos específicos para la detección de enrofloxacin (Rosa Enroflox y Equinox), gentamicina (Snap Gentamicin) y para las tetraciclinas (Rosa TET, Snap TET y Twinsensor TET).

Una vez más, se debe destacar que dicha asociación de métodos basados en la similitud de su sensibilidad hacia los agentes antimicrobianos capaces de detectar, excluye a otras moléculas que, aunque se emplean en forma importante en España, los métodos no poseen la capacidad de detectarlas a concentraciones cercanas a sus Límites Máximos de Residuos.

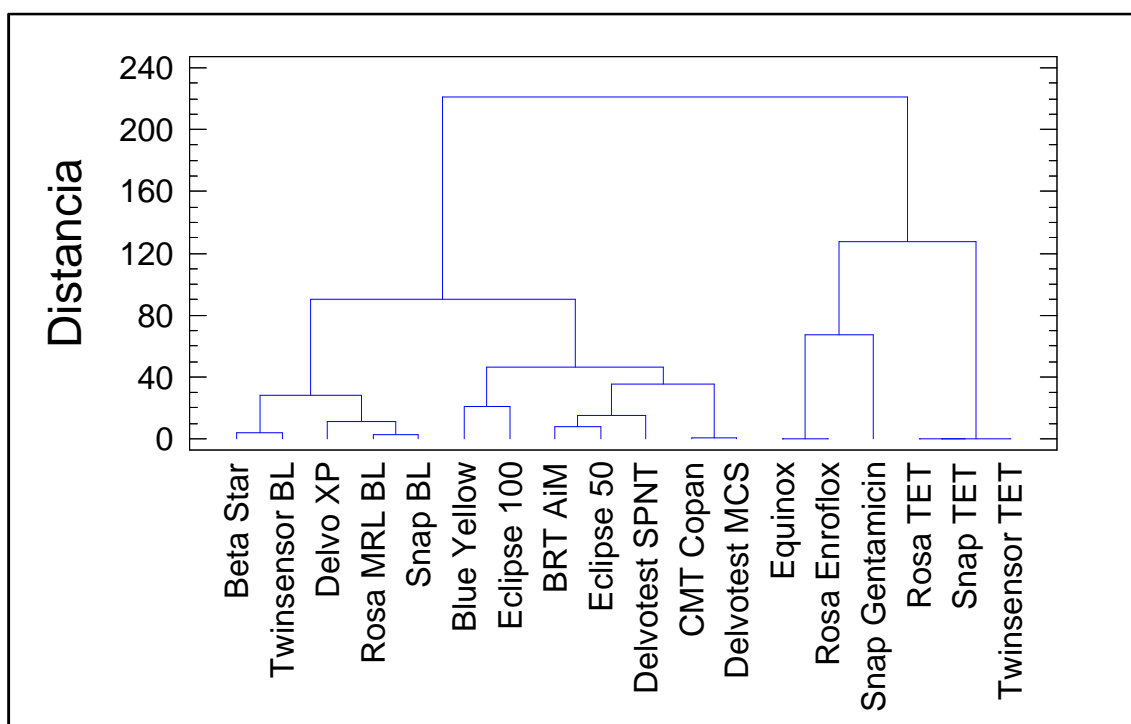


Figura 38. Dendrograma del análisis cluster basado en la sensibilidad de los métodos de cribado

A modo de síntesis del análisis de conglomerado se puede establecer que los métodos BRT AiM, Blue Yellow, CMT Copan, Delvotest MCS Accelerator, Delvotest SP-NT, Eclipse 50 y Eclipse 100 presentan un comportamiento similar en lo que respecta a su sensibilidad para la detección de antimicrobianos presentes en la leche.

Los métodos de receptores proteicos Beta Star, Twinsensor, Delvo XP, Rosa MRL BL y Snap BL también poseen valores de sensibilidad similares para la detección de antibióticos betalactámicos en la leche. Por último los métodos específicos para la detección de tetraciclinas (Rosa TET, Snap TET y Twinsensor TET), enrofloxacin (Rosa Enroflox y Equinox) y gentamicina (Snap Gentamicin) constituyen un grupo independiente con una muy buena sensibilidad para las diferentes moléculas para los cuales fueron diseñados.

2.2. Análisis estadístico mediante la técnica de Análisis por Componentes Principales (PCA)

Debido a la diferencia que presentaron los métodos microbiológicos con respecto a los métodos específicos en el análisis por conglomerados estudiado anteriormente, se procedió a aplicar el Análisis por Componentes Principales como técnica de análisis multivariante a cada uno de los grupos de métodos de cribado por separado.

2.2.1. Métodos microbiológicos

En el Análisis por Componentes Principales (del inglés Principal Component Analysis, PCA) se seleccionaron dos factores que explican la mayor varianza del sistema, el primer factor con un autovalor de 4,92 que explica el 70,30% de la varianza total del sistema y el segundo factor con un autovalor de 0,89 que explican el 12,79% de la varianza, en total ambos factores explican el 83,09% de la variabilidad de los datos originales.

El Cuadro 29 muestra las cargas (“loading”) de cada método microbiológico en los dos ejes que representan los componentes principales después de aplicar una rotación Varimax, junto a la variabilidad estimada para cada método en los nuevos ejes principales. Los valores correspondientes a la variabilidad explicada se pueden interpretar como una estimación de la proporción de sensibilidad por los nuevos ejes para cada método.

Los métodos BRT AiM, CMT Copan, Delvotest MCS Accelerator, Delvotest SP-NT y Eclipse 50 poseen elevadas cargas en el eje CP1, indicando que los resultados de sensibilidad obtenidos para las diferentes moléculas ensayadas en estos métodos son similares. Por el contrario el Blue Yellow y Eclipse 100 presentan elevadas cargas en el eje CP2 en comparación con los demás métodos microbiológicos.

Cuadro 29. Cargas de las variables para los dos primeros componentes principales en los métodos microbiológicos

Método	Componente Principal		Variabilidad Explicada
	CP1	CP2	
BRT AiM	0,682	0,609	0,824
Blue Yellow	0,140	0,913	0,854
CMT Copan	0,886	0,339	0,902
Delvotest MCS ¹	0,799	0,393	0,794
Delvotest SP-NT	0,957	0,0968	0,926
Eclipse 100	0,445	0,781	0,809
Eclipse 50	0,701	0,461	0,705

¹Delvotest MCS Accelerator

En la Figura 39 se representan las distribuciones de los métodos microbiológicos en ambos ejes (CP1 y CP2). Se observa que los métodos BRT AiM, CMT Copan, Delvotest MCS Accelerator, Delvotest SP NT y Eclipse 50 forman un grupo distinto a los métodos Blue Yellow y Eclipse 100. Estas diferencias también se observaron en el análisis cluster (Figura 38) y se debe principalmente a que los dos últimos métodos microbiológicos no poseen sensibilidad para detectar residuos de tilosina en la leche a niveles igual al LMR en comparación con los demás métodos microbiológicos (Cuadro 23).

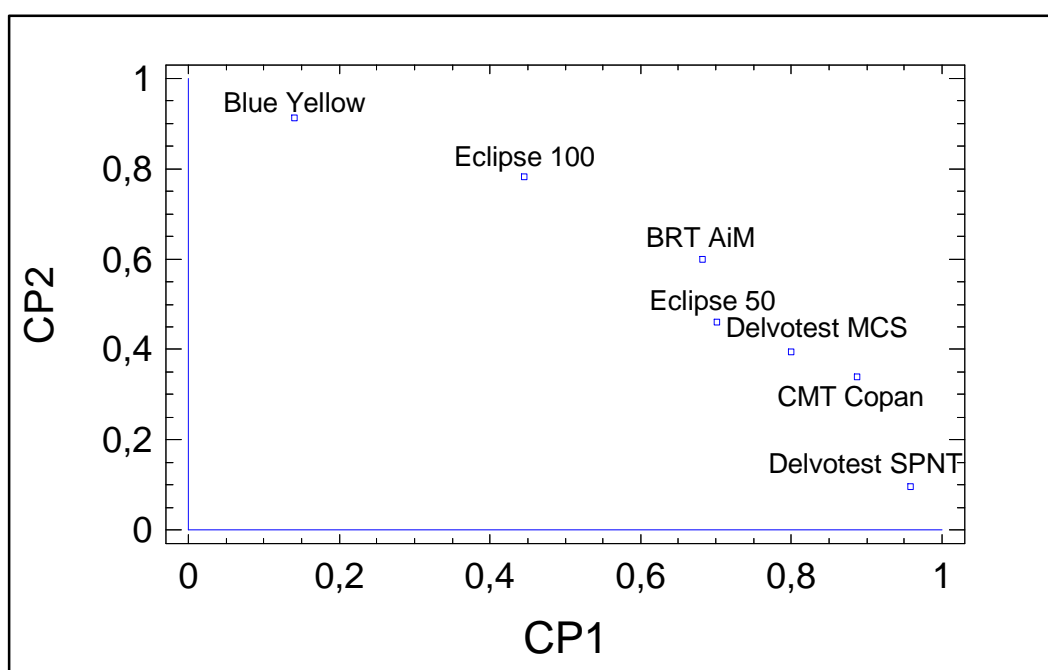


Figura 39. Análisis de componentes principales de los métodos microbiológicos

2.2.2. Métodos específicos (cualitativos de confirmación)

En este caso, al igual que para los métodos microbiológicos, se utilizó el PCA y se eligieron dos componentes principales que explican la mayor variabilidad del sistema. El primer componente posee un autovalor de 4,04 y explica el 80,91% de la variabilidad de la sensibilidad de los métodos, mientras que el segundo factor tiene un autovalor de 0,64 y explica el 10,80% de la variabilidad de los datos. De este modo se logra resumir la información mediante el PCA con una variabilidad total acumulada del 91,71% de los datos originales.

Las cargas de cada uno de los métodos específicos en los nuevos ejes principales luego de aplicar una rotación Varimax y las variabilidades explicadas para cada método se resumen en el Cuadro 30.

Se aprecia en dicho cuadro que el Delvo XP, Rosa MRL BL y Snap BL presentan elevadas cargas en el eje CP1 por lo que estos métodos presentan valores de sensibilidad similares para los distintos antibióticos ensayados, mientras que en Beta Star y Twinsensor estas elevadas puntuaciones se encuentran en el eje CP2.

Cuadro 30. Cargas de las variables para los dos primeros componentes principales en los métodos específicos

Método	Factor Correlacionado		Variabilidad Explicada
	CP1	CP2	
Beta Star	0,299	0,938	0,928
Delvo XP	0,9212	0,254	0,723
Rosa MRL BL	0,760	0,504	0,858
Snap BL	0,813	0,536	0,969
Twinsensor BL	0,504	0,815	0,930

Con el fin de visualizar la distribución de los métodos específicos en el nuevo espacio vectorial se construyó la Figura 40. El eje CP1 explica las diferencias en la variabilidad de la sensibilidad del Delvo XP, Rosa MRL BL y Snap BL, que se encuentran separados de los métodos Beta Star y Twinsensor BL. Esta asociación entre los métodos rápidos también se observó en el estudio por conglomerados (Figura 38), ya que estos métodos constituyen un cluster fuertemente asociado. Al respecto, resulta interesante destacar que los métodos Beta Star y Twinsensor presentan muy buena sensibilidad para cloxacilina y baja sensibilidad para cefalexina en comparación con los demás métodos específicos.

Los métodos Delvo XP, Rosa MRL BL y Snap BL se sitúan muy próximos en los ejes factoriales, señalando una gran similitud en su sensibilidad para los antibióticos betalactámicos que detectan.

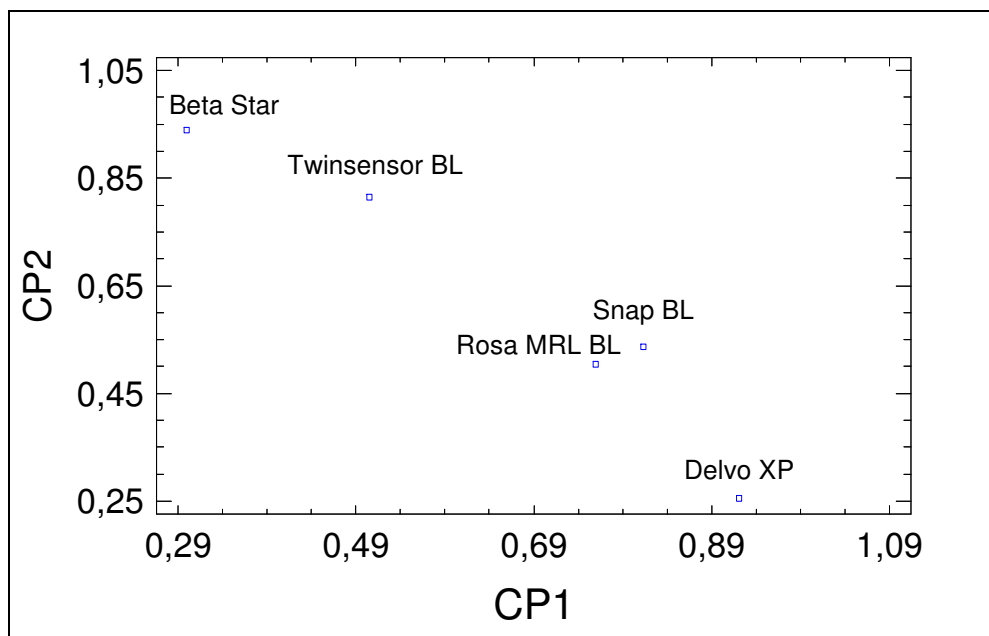


Figura 40. Análisis de componentes principales de los métodos específicos

2.3. Porcentaje de cobertura de los métodos de cribado en la detección de los antibióticos utilizados en España en el ganado vacuno lechero

A partir de las frecuencias de uso de los fármacos que se emplean en España para el tratamiento del ganado vacuno lechero presentados en el Cuadro 4 de la Introducción y los resultados de sensibilidad obtenidos en el Estudio 1 del presente trabajo, se han calculado mediante la aplicación de la Ecuación I expuesta en Material y Métodos, los porcentajes de cobertura de los diferentes métodos de cribado. Los resultados obtenidos se presentan en los Cuadros 31 y 32 donde se exponen los porcentajes de cobertura de los métodos microbiológicos y los métodos específicos, respectivamente. También se muestran en ambos cuadros, la frecuencia de cada familia de antimicrobiano capaz de ser detectada por el método.

Los porcentajes de antibióticos detectados mediante el empleo de métodos microbiológicos se hallan comprendidos entre el 51,3% (Eclipse 50) y el 70,4% (Blue Yellow). Hay que destacar que los métodos BRT AiM (66,5%) y Delvotest MCS Accelerator (67,9%) también presentan una elevada frecuencia de detección de antibióticos en leche. Esto es debido a que los tres métodos (Blue Yellow, BRT AiM y Delvotest MCS Accelerator) pueden detectar residuos de neomicina a un nivel equivalente a su LMR, y al hecho de que la neomicina es un aminoglucósido que se

utiliza en España con una frecuencia considerable (10,72%), según los estudios realizados por Zorraquino y col. (2007) y Zorraquino (2008).

Cuadro 31. Porcentaje de cobertura de métodos microbiológicos empleados en la detección de antibióticos en leche

Métodos Microbiológicos	Porcentaje de cobertura	Detección
BRT AiM	66,5	100% penicilinas 66,8% cefalosporinas 100% neomicina
Blue Yellow	70,4	96,7% penicilinas 100% cefalosporinas 53,3% oxitetraciclina 100% eritromicina 100% neomicina
CMT Copan	63,7	100% penicilinas 84,6% cefalosporinas 10% neomicina
Delvotest MCS ¹	67,9	99,1% penicilinas 77,5% cefalosporinas 100% neomicina
Delvotest SP-NT	56,0	98,8% penicilinas 68,5% cefalosporinas
Eclipse 50	51,3	90,8% penicilinas 70,0% cefalosporinas
Eclipse 100	61,8	88,7% penicilinas 77,4% cefalosporinas 0% neomicina

¹Delvotest MCS Accelerator

Todos estos métodos detectan en diferente porcentaje los residuos de penicilinas y cefalosporinas, además de la neomicina (a excepción de Delvotest SP-NT Eclipse 50 y Eclipse 100). Por su parte, el método Blue Yellow puede detectar hasta el 100% de los residuos de eritromicina y el 53,3% de oxitetraciclina (a niveles equivalentes a sus LMRs), encontrándose esta última molécula entre los antibióticos que deben ser analizados en el plan de control de residuos establecido en el Real Decreto 1728/2007.

Con respecto a los métodos específicos (Cuadro 32), la frecuencia de detección de antibióticos en la leche es más baja que la observada para los métodos microbiológicos y se halla comprendida entre el 29,7% para el Delvo XP y el 54,6% para el Beta Star. Esta menor frecuencia en la cobertura de detección de residuos de antibióticos en comparación con los métodos microbiológicos se debe a que estos últimos permiten detectar otras moléculas diferentes a los betalactámicos tales como neomicina, eritromicina y oxitetraciclina, mientras que los métodos específicos, como indica su nombre han sido desarrollados solo para el análisis de betalactámicos.

Cuadro 32. Porcentaje de cobertura de métodos específicos empleados en la detección de antibióticos en leche

Método específicos	Porcentaje de cobertura	Detección
Beta Star	54,6	99,1% penicilinas 62,7% cefalosporinas
Delvo XP	29,7	46,5% penicilinas 68,3% cefalosporinas
Rosa MRL BL	53,5	87,7% penicilinas 100% cefalosporinas
Snap BL	52,4	85,6% penicilinas 100% cefalosporinas
Twinsensor BL	46,5	75,5% penicilinas 73,3% cefalosporinas

Todos estos métodos detectan residuos de penicilinas y cefalosporinas aunque en diferente grado. Por ejemplo, Beta Star, Rosa MRL BL y Snap BL presentan elevados porcentajes de detección de penicilinas (superior al 85%), ampliamente utilizadas en el tratamiento de diferentes patologías del ganado vacuno en España (Zorraquino y col., 2007 y Zorraquino 2008). Con respecto a las cefalosporinas, los métodos Beta Star y Delvo XP presentan bajos niveles de detección (inferiores al 70%), en comparación con el resto de métodos rápidos, resultado menos recomendable a la hora de comparar los resultados.

Por otro parte como ya se ha comentado con anterioridad, el Real Decreto 1728/2007 establece la obligatoriedad de realizar en las explotaciones y centros lácteos pruebas *in situ* de detección de antibióticos. Para las pruebas de detección de antibióticos *in situ* que se realicen en la explotación, en el Anexo IV de dicho Real Decreto se detalla que se deben realizar análisis que, al menos, detecten antibióticos de los grupos betalactámicos y tetraciclinas antes de cargar la leche en la cisterna. En cuanto a los centros lácteos la prueba de detección de antibióticos *in situ* se efectuará previamente a la descarga de la leche en los silos de almacenamiento. En este caso se realizará una prueba para la detección de residuos de antibióticos del grupo de los betalactámicos en todas las cisternas que lleguen al centro lácteo y una prueba de detección de residuos de tetraciclinas, en una de cada 5 cisternas de transporte, de manera que todas las rutas sean analizadas, una vez al mes. En la práctica se utilizan para la prueba *in situ* de detección de antibióticos métodos específicos que permiten obtener una respuesta en un corto periodo de tiempo (5-15 min.).

Además en el Anexo IV de dicho Real Decreto, tanto para las pruebas realizadas en la explotación como en los centros lácteos, se indica que *“los métodos utilizados deberán ser capaces de detectar al menos la amoxicilina y ampicilina, entre los betalactámicos y la oxitetraciclina, entre las tetraciclinas. Los métodos utilizados podrán ser específicos de cada grupo y, opcionalmente, se podrán utilizar pruebas capaces de detectar simultáneamente ambos grupos, siempre y cuando se cumpla la frecuencia del grupo de análisis de los betalactámicos, así como los LMR. En el caso de que dicha prueba resulte no conforme (positiva), se puede realizar una segunda prueba in situ, utilizando un método con un perfil de detección equivalente y una base analítica distinta”*.

En cuanto a la prueba de detección de antibióticos que se deben realizar en los laboratorios de control, se establece que para todas las muestras recibidas se utilicen métodos que, al menos, detecten residuos de betalactámicos y de tetraciclinas y en el caso de que se utilice un método sensible a ambos grupos de sustancias y el resultado fuera no conforme, el laboratorio procederá a la identificación del grupo. En este caso los laboratorios de control de forma habitual utilizan métodos microbiológicos que poseen un mayor espectro de detección, aunque en la mayoría de los casos, como se ya se ha visto, no tienen una buena sensibilidad para las tetraciclinas.

Por ello, basándose en la estrategia de control establecida en el Real Decreto, se evaluó la posibilidad de emplear la combinación de dos métodos basados en diferentes principios analíticos (microbiológicos-receptor proteico), con la finalidad de evaluar el porcentaje de cobertura de antibióticos en la leche. Los resultados obtenidos se exponen en el Cuadro 33, donde se señalan las frecuencias de moléculas que son detectadas mediante el uso simultáneo de los métodos microbiológicos y los métodos específicos. También se muestra en el cuadro 33, la frecuencia de cada familia de antimicrobianos que se pueden detectar mediante el uso de las dos metodologías analíticas.

Las combinaciones de dos métodos se establecieron teniendo en cuenta los fármacos que no son detectados por un método y que si pueden serlo por el otro método. Así por ejemplo el método BRT AiM detecta el 100% de las penicilinas y el 66,8% de las cefalosporinas, así que debe complementarse con un método específico que mejore la detección de las cefalosporinas, como por ejemplo el Snap BL y el Rosa MLR BL con un 100% de sensibilidad para este grupo de antibióticos. Además, se consideró interesante incorporar el método Eclipse 100 por tratarse de un método microbiológico fabricado en España, lo que permite una mayor disponibilidad del producto.

Cuadro 33. Porcentaje de cobertura de posibles combinaciones de dos métodos que presentan diferente base analítica

Método microbiológico	Método específico	Porcentaje de cobertura	Detección
BRT AiM	Snap BL	70,1	100% Penicilinas 100% Cefalosporinas 100% Neomicina
BRT AiM	Rosa MRL BL	70,1	100 % Penicilinas 100% Cefalosporinas 100% Neomicina
Blue Yellow	Beta Star	71,5	100% Penicilinas 96% Cefalosporinas 53,3% Oxitetraciclina 100% Neomicina 100% Eritromicina
Delvotest MCS ¹	Snap BL	71,0	100% Penicilinas 99,7% Cefalosporinas 100% Neomicina 100% Tilosina
Delvotest MCS ¹	Rosa MRL BL	71,0	99,7% Penicilinas 100% Cefalosporinas 100% Neomicina 100% Tilosina
Eclipse 100	Snap BL	66,3	92,2% Penicilinas 100% Cefalosporinas 100% Neomicina
Eclipse 100	Rosa MRL BL	65,8	91,0% Penicilinas 100% Cefalosporinas 100% Neomicina
Eclipse 100	Beta Star	70,0	99,7% Penicilinas 100% Cefalosporinas 100% Neomicina

¹Delvotest MCS Accelerator

Del análisis del Cuadro 33 se puede observar que las frecuencias de cobertura de antimicrobianos para las ocho combinaciones de métodos resultan muy similares entre sí, al hallarse comprendida entre el 65,8% (Eclipse 100 y Rosa MLR BL) y el 71,5 (Blue Yellow y Beta Star). También, se aprecia que el porcentaje de cobertura de antibióticos a detectar no se incrementa notablemente con respecto al calculado para los métodos microbiológicos. Así, por ejemplo, el uso del método Blue Yellow permite detectar un 70,4% (Cuadro 31) de los antibióticos utilizados en España, valor muy similar al 71,5% (Cuadro 33) cuando se utiliza combinado con el Beta Star.

Además, como se ha comentado anteriormente el Real Decreto 1728/2007 especifica la obligatoriedad de utilizar métodos que al menos detecten residuos de amoxicilina, ampicilina y oxitetraciclina en las explotaciones y centros lácteos, y de betalactámicos y tetraciclinas en los laboratorios de control pero en este caso sin especificar que sustancias, por eso se ha considerado interesante implementar metodologías analíticas que detecten antibióticos pertenecientes al grupo de las tetraciclinas, tales como Rosa TET, Snap TET y Twinsensor TET que poseen una sensibilidad del 100% para la detección de residuos de oxitetraciclina en la leche ya que los métodos microbiológicos presentan una escasa sensibilidad para la oxitetraciclina.

De este modo, los porcentajes de cobertura del Cuadro 33 se verían incrementados en un 2,25% cuando las muestras de leche se analizan también con un método específico para las tetraciclinas, como por ejemplo las combinaciones Blue Yellow- Beta Star – Rosa TET (73,8%), Delvotest MCS Accelerator – Rosa MLR BL – Rosa MLR TET (73,3%) o Eclipse 100 – Beta Star BL – Twinsensor TET (72,3%).

Actualmente, las casas fabricantes han desarrollado métodos rápidos combinados que permiten el análisis de betalactámicos y tetraciclinas de forma simultánea (como por ejemplo Beta Star Combo y Twinsensor BL-TET) lo que facilita el uso y disminuye el coste de las determinaciones analíticas.

También estos porcentajes de cobertura comentados anteriormente pueden incrementarse con el empleo de otros métodos específicos para ciertas moléculas, especialmente para aquellos antibióticos que presentan una importante frecuencia de uso en España (Zorraquino y col., 2007 y Zorraquino 2008), como por ejemplo la gentamicina (5,7%) y/o la enrofloxacin (2,3%), por eso resulta curioso que el Real Decreto 1728/2007 especifique la obligación de detectar residuos de tetraciclinas y no de otros grupos de sustancias que presentan un mayor uso en España.

Por este motivo, la implementación de forma periódica (cada cinco cisternas o análisis semanales) en el sistema de control de métodos de cribado específicos producirán un incremento en la frecuencia de detección de residuos de antibióticos en leche. Así, a modo de ejemplo, en caso de incorporar al sistema de dos métodos Blue Yellow- Beta Star (71,5%), periódicamente análisis con Rosa TET (2,3%), Snap Gentamicin (5,7%) y Equinox (2,3%) el porcentaje de cobertura se incrementaría a un 81,8%.

A modo de síntesis se puede establecer que no existe un único método de cribado que pueda cubrir la detección de la totalidad de los antibióticos utilizados con mayor frecuencia en España en el tratamiento del ganado vacuno lechero. Sin embargo, es posible establecer algunas mejoras a fin de lograr una detección más eficiente de los residuos de antibióticos en la leche que tienda a garantizar su inocuidad y, por consiguiente, de los productos lácteos derivados.

En efecto, la incorporación de un método específico como Snap Gentamicin y Equinox o Rosa Enroflox a los métodos de microbiológicos o a las combinaciones de “microbiológico-específicos” permitiría incrementar el porcentaje de cobertura de antibióticos en leche a valores cercanos al 80%.

Por último, deberían también implementarse controles periódicos de residuos de estreptomicina y kanamicina en la leche, ya que ambos antibióticos presentan una frecuencia de uso considerable en España (6,91% y 4,23%, respectivamente), aunque esto resulta muy dificultoso desde el punto de vista práctico dado que existen pocos métodos comerciales que detecten estas sustancias y los que se encuentran se basan en técnicas de inmunoensayo (ELISA) o radio-inmunoensayos (Charm II) lo que implica una mayor dificultad analítica, así como un coste más elevado.

También hay que tener presente que estas combinaciones de métodos podrían verse modificadas con el tiempo, debido principalmente a cambios en la frecuencia de uso de antibióticos y a la posible comercialización de nuevos métodos de cribado con mayor sensibilidad a determinados antibióticos y/o un mayor espectro de cobertura.

Por ello, establecer una posible recomendación de un método o un conjunto de métodos resulta muy difícil, puesto que dependerá de la frecuencia de uso de cada antibiótico en España (factores que pueden experimentar variaciones con el tiempo, ya sea por la comercialización de otros antibióticos no considerados en el análisis estadístico, el cambio en los costes de algunos antibióticos que estará acompañado de modificaciones en las frecuencias de sus usos, etc.) y por la comercialización de nuevos métodos de cribado.

Otros factores no considerados en el tratamiento estadístico de los datos, pueden llegar a contemplarse en el momento de decidir la implementación de alguna estrategia analítica, como por ejemplo, el coste de los métodos de cribado, la velocidad de entrega o suministro de estos métodos, el asesoramiento que las casas comerciales puedan proporcionar a los laboratorios encargados del control de residuos, o las fechas de caducidad de cada uno de ello, entre los más importantes.

3. TERCER ESTUDIO: Influencia de los factores relacionados con la toma muestras sobre la respuesta de los métodos microbiológicos de detección de antibióticos en la leche de vaca

Los resultados correspondientes al tercer estudio sobre la influencia de los factores relacionados con la toma de muestras (tiempo de refrigeración y azidiol) sobre la respuesta de los métodos microbiológicos se exponen seguidamente divididos en apartados según el antibiótico estudiado.

3.1. Penicilinas

3.1.1. Amoxicilina

En el Cuadro 34 se muestran los principales parámetros estadísticos calculados mediante la aplicación del modelo de regresión logística. Se puede observar que la concentración de amoxicilina (C), el tiempo de refrigeración (R) y la interacción entre tiempo de refrigeración y azidiol (R*A) influyen de forma significativa sobre la frecuencia de resultados positivos de los métodos microbiológicos utilizados (BRT AiM, Delvotest MCS Accelerator y Eclipse 100). Por el contrario, la presencia de azidiol (A) en las muestras de leche no presenta ningún efecto significativo ($p > 0,001$) sobre los resultados.

Cuadro 34. Valores de chi-cuadrado (χ^2) y probabilidad (p) de los factores de variación de la respuesta de los métodos microbiológicos para la detección de amoxicilina en la leche

Método	Concentración (C)		Refrigeración (R)		Azidiol (A)		R*A	
	χ^2	p	χ^2	p	χ^2	p	χ^2	p
BRT AiM	528,64	0,000	29,18	0,000	0,34	0,555	123,88	0,000
Delvotest MCS ¹	927,07	0,000	191,39	0,000	0,19	0,657	105,83	0,000
Eclipse 100	998,03	0,000	45,72	0,000	0,24	0,623	5,21	0,022

¹Delvotest MCS Accelerator

A su vez, en el Cuadro 35 se exponen las ecuaciones de predicción para los resultados positivos con los métodos microbiológicos cuando se analizan muestras de leche con amoxicilina. Así, en las ecuaciones del Cuadro 35 solamente se presentan aquellos parámetros que resultan significativos (Cuadro 34) en cada método junto a sus coeficientes, β_1 para la concentración (C), β_2 para el tiempo de refrigeración (R: 0, 24, 48 o 72 horas), β_3 para el azidiol (sin conservante: 1 y con azidiol: 0) y β_{23} para la interacción entre el tiempo de refrigeración y el azidiol (R*A).

Cuadro 35. Ecuaciones de predicción de la respuesta de los métodos microbiológicos para la detección de amoxicilina en la leche

Método	Logist [P]= $\beta_0 + \beta_1 [C] + \beta_2 [R] + \beta_3 [A] + \Sigma \beta_{23} [R]_i * [A]$	Test de bondad del ajuste	
		χ^2	p
BRT AiM	$L = -5,8882 + 3,2124C - 0,03294R - 0,0874R * A$	1,435	0,697
Delvotest MCS ¹	$L = -18,4323 + 10,1923C - 0,03549R - 0,0378R * A$	1,043	0,152
Eclipse 100	$L = -40,4691 + 14,2585C - 0,0410R - 0,0211R * A$	3,184	0,364

¹Delvotest MCS Accelerator; L: ln (Probabilidad (+)/1-Probabilidad (+)); C: concentración de amoxicilina; R: tiempo de refrigeración (0, 24, 48 o 72 horas); A: azidol (sin conservante=1 y con azidol=0).

En el caso del coeficiente β_1 un elevado valor de este parámetro en las ecuaciones indica que pequeños incrementos en la concentración de antibiótico, en este caso la amoxicilina, producirá aumentos más elevados en la frecuencia de resultados positivos de los métodos, mientras valores menores señalan que se requiere una mayor concentración de amoxicilina para alcanzar resultados positivos.

En este experimento, los tres métodos obtienen coeficientes β_1 elevados para la amoxicilina. No obstante, el valor de este coeficiente para el método BRT AiM es menor que los observados en los otros métodos microbiológicos, motivo por el cual se puede decir que este método necesita de mayores incrementos en la concentración de amoxicilina para producir respuestas positivas.

A su vez, los coeficientes β_2 y β_{23} que afectan al efecto de la refrigeración (R) y a la interacción R*A (refrigeración*azidol) de las ecuaciones logísticas (Cuadro 34) son de signo negativo para los tres métodos microbiológicos estudiados, lo que indica que la frecuencia de resultados positivos disminuye en la medida que se prolonga el tiempo de análisis de las muestras refrigeradas. Por ello, la prolongación del tiempo de refrigeración desplaza la curva logística hacia la derecha, a mayores concentraciones de amoxicilina, es decir, se produce una pérdida de la actividad antimicrobiana de esta penicilina. Esto señala que las muestras refrigeradas deben estar adicionadas con mayores concentraciones para producir la misma frecuencia de respuestas positivas a los métodos. El signo negativo de la interacción entre el conservante y el tiempo de refrigeración (R*A) muestra una menor pérdida de la actividad antimicrobiana de la amoxicilina debida a la refrigeración cuando la muestra de leche está conservada con azidol.

Para los tres métodos microbiológicos, el test de bondad de ajuste (χ^2 y p), del Cuadro 35, muestra que los valores experimentales resultan similares a los estimados por el modelo logístico, señalando un adecuado ajuste del mismo ($\chi^2 < 3,98$ y $p > 0,05$).

En la Figura 41 se representan los efectos de aquellos parámetros que afectan en forma significativa (Cuadro 34) a la curva dosis-respuesta de la amoxicilina analizada mediante los métodos microbiológicos BRT AiM, Delvotest MCS Accelerator y Eclipse 100.

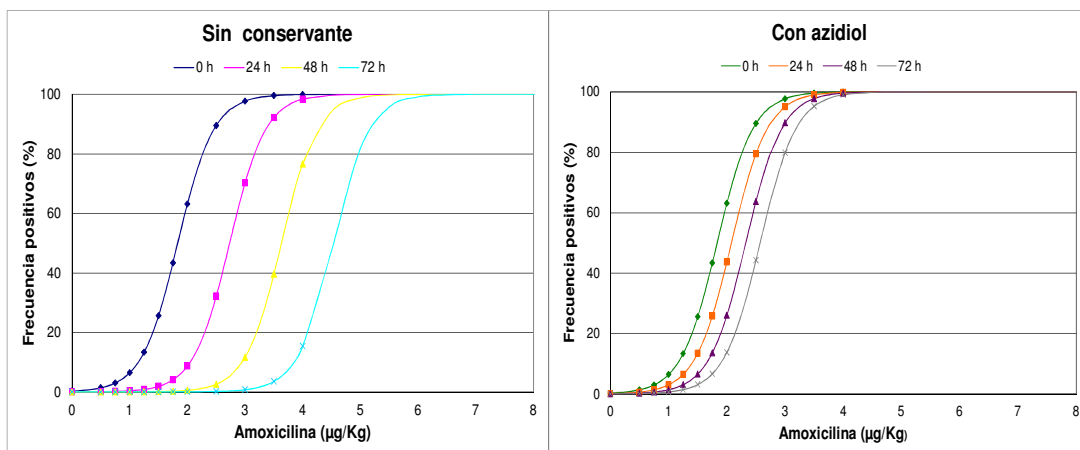
En estas curvas se representa la frecuencia de resultados positivos obtenidos para las concentraciones de amoxicilina en los distintos tiempos de refrigeración de las muestras de leche con amoxicilina. Para cada método microbiológico se muestran dos figuras (sin conservante y con azidiol).

En caso de utilizar azidiol como conservante, las curvas logísticas se sitúan más próximas a la obtenida en muestras sin refrigerar, es decir, la adición de conservante permite mantener la acción antimicrobiana de la amoxicilina en el tiempo. Por ello, en las figuras se visualiza que la frecuencia de resultados positivos disminuye con el tiempo de refrigeración (R), especialmente para las muestras sin conservante.

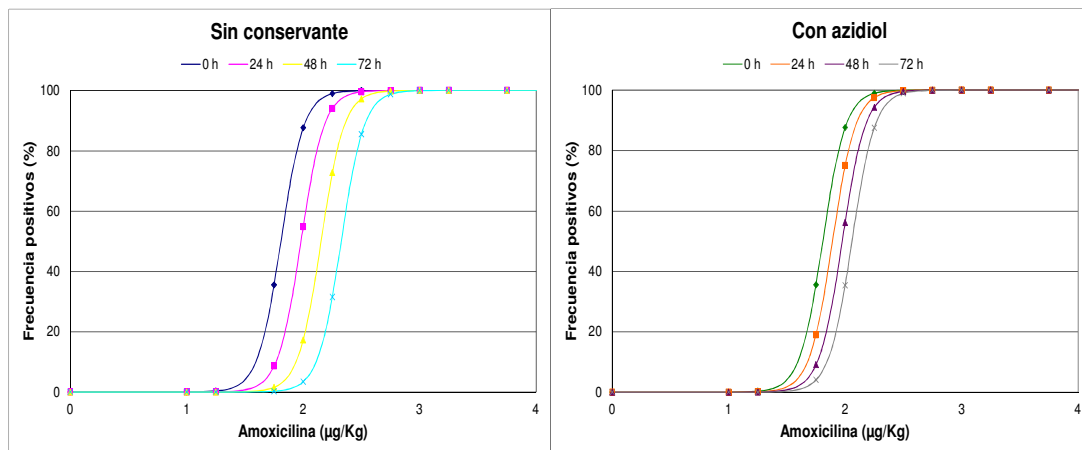
Por otra parte, cuando se comparan las curvas dosis-respuestas de los tres métodos, se aprecia que se necesitan menores concentraciones de amoxicilina para obtener el 100% de los resultados positivos en el método Delvotest MCS Accelerator en comparación con los métodos BRT AiM y Eclipse 100, debido a una mayor sensibilidad del primer método en comparación con los últimos.

Aunque el tiempo de refrigeración resultó significativo sobre la respuesta de los métodos microbiológicos ensayados, su efecto sobre la curva dosis-respuesta no es el mismo para los tres métodos, puesto que, estas curvas construidas a las 0, 24, 48 y 72 horas para los métodos BRT AiM y Delvotest MCS Accelerator se encuentran más alejadas que para el método Eclipse 100.

BRT AiM



Delvotest MCS



Eclipse 100

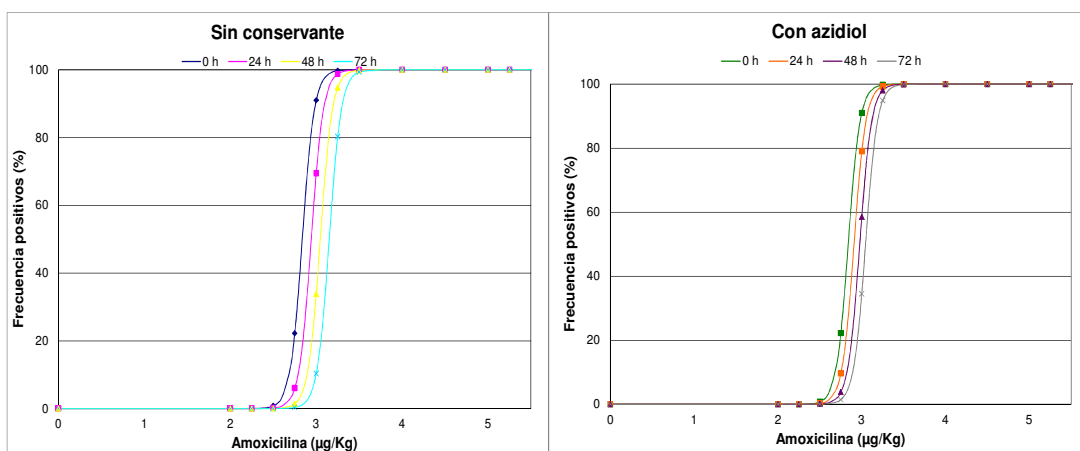


Figura 41. Efecto del conservante y tiempo de refrigeración de las muestras de leche sobre la curva dosis-respuesta de los métodos microbiológicos para la amoxicilina

A su vez, los resultados del modelo logístico (Cuadro 35) señalan menor valor de la interacción R*A para el método Eclipse 100 ($\beta_{23} = -0,0211$) que para los métodos BRT AiM ($\beta_{23} = -0,08743$) y Delvotest MCS Accelerator ($\beta_{23} = -0,03780$), poniendo de manifiesto una mayor similitud en las curvas dosis-respuestas a medida que transcurre el tiempo de refrigeración del Eclipse 100 en comparación con los otros dos utilizados.

Por ello, con el propósito de evaluar de forma puntual el efecto de cada uno de los tiempos de refrigeración sobre las curvas dosis-respuestas de las muestras de leche con amoxicilina respecto aquellas no refrigeradas (0 horas), se aplicó el modelo de regresión logístico a los diferentes intervalos de tiempo (0-24 horas, 0-48 horas y 0-72 horas). Los resultados de los estadísticos χ^2 y p se muestran en el Cuadro 36.

Cuadro 36. Efecto del tiempo de refrigeración y la interacción entre tiempo de refrigeración y azidiol sobre los métodos microbiológicos en el análisis de muestras de leche con amoxicilina

Horas de refrigeración	Método	Refrigeración (R)		R*A	
		χ^2	p	χ^2	p
0-24	BRT AiM	0,201	0,654	1,729	0,188
	Delvotest MCS ¹	0,000	1,000	0,000	1,000
	Eclipse 100	0,000	1,000	0,000	1,000
0-48	BRT AiM	0,769	0,381	200,46	0,000
	Delvotest MCS ¹	0,000	1,000	102,56	0,000
	Eclipse 100	0,000	1,000	36,21	0,000
0-72	BRT AiM	7,45	0,006	123,25	0,000
	Delvotest MCS ¹	78,71	0,000	30,49	0,000
	Eclipse 100	96,07	0,000	15,26	0,000

¹Delvotest MCS Accelerator; R*A: interacción entre tiempo de refrigeración y azidiol

En dicho análisis estadístico se consideraron los parámetros del tiempo de refrigeración (R) y la interacción entre tiempo de refrigeración y azidiol (R*A), de las muestras conservadas en refrigeración durante 24, 48 y 72 horas con respecto a las muestras adicionadas con amoxicilina y sin refrigerar (tiempo cero).

Se observa que el tiempo de refrigeración (R) afecta de forma significativa ($p < 0,001$) a la respuesta de los métodos al analizar muestras de leche con amoxicilina que fueron refrigeradas 72 horas. También, la interacción entre el tiempo de refrigeración y azidiol resulta significativa sobre la respuesta de los métodos microbiológicos a partir de las 48 horas de conservación de las muestras de leche con amoxicilina, señalando que a partir de dicho tiempo se obtienen resultados distintos entre las muestras refrigeradas con azidiol respecto aquellas sin conservante.

Se debe considerar que en los laboratorios de control de calidad, las muestras de leche pueden permanecer refrigeradas hasta el momento de ser analizadas. Por ello, existen estudios que evalúan la influencia del tiempo de refrigeración sobre la estabilidad y/o la degradación de sustancias antimicrobianas en la leche mediante técnicas cromatográficas, y cuantifican la disminución de la concentración de amoxicilina en la leche debida al tiempo de refrigeración (Riediker y col., 2004; Roca y col., 2009)

En este caso, debido a que los métodos microbiológicos utilizados presentan una respuesta de tipo dicotómica (positiva o negativa) y lo que ponen en evidencia es la capacidad de un antibiótico de inhibir el crecimiento del microorganismo de prueba del método, se ha considerado que los factores de variación pueden afectar a esta capacidad inhibidora que se ha definido como actividad antimicrobiana. Así, se han estimado las pérdidas de esta actividad antimicrobiana (PAA) de la amoxicilina a partir de las respuestas de los métodos de cribado.

Para ello, se calcularon los límites de detección (LD) a partir de las ecuaciones obtenidas mediante la aplicación del modelo de regresión logística (Cuadro 35), para muestras de leche sin conservante y sin refrigerar. Estos límites de detección corresponden a la concentración de antibiótico que produce un 95% de resultados positivos, según el criterio propuesto por la Federación Internacional de Lechería (UNE- EN ISO 13969:2003a) para los métodos microbiológicos con interpretación visual de los resultados (cambio de color del indicador).

De esta forma, los límites de detección para la amoxicilina en muestras de leche sin conservante y sin refrigerar son para los métodos BRT AiM, Delvotest MCS Accelerator y Eclipse 100 de 3, 2 y 3 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, respectivamente. Los valores calculados para los métodos BRT AiM y Delvotest MCS Accelerator se encuentran dentro de los límites indicados por los fabricantes para la amoxicilina (2-3 $\mu\text{g}/\text{Kg}$). Mientras que en el Eclipse 100 el límite obtenido en este estudio (3 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) es inferior al indicado por Zeu-

Inmunotec (5 µg/Kg), lo que podría atribuirse a que se han utilizado diferentes procedimientos para su cálculo.

Los límites de detección calculados para la amoxicilina mediante el método BRT AiM (3 µg/Kg) resultan similares a los obtenidos por Frank (1995) que presentó un rango entre 2 y 4 µg/Kg. Por el contrario son inferiores a los establecidos por otros autores con valores desde el 5 a 10 µg/Kg (Jaskch 1988; Charm y Ruth 1993; Zorraquino 1998).

En la leche de oveja los límites de detección del BRT calculados por Althaus y col. (2001) fueron de 6 µg/Kg, mientras que en leche de cabra Sierra y col. (2010a) obtuvieron 4 µg/Kg. Todos estos límites son superiores a los 3 µg/Kg calculados en este estudio para la leche de vaca.

Respecto al método Delvotest, cuando se utiliza con leche de vaca, Charm y Ruth (1993); Gist Brocades (1997); Honkanen-Buzalski y Reybroeck (1997); Lacroix (1995); Senyk y col. (1990) y Sicho (1996) señalaron límites superiores a los estimados en este trabajo (10 µg/Kg, 5-6 µg/Kg, 6 µg/Kg, 3 µg/Kg, 11-18 µg/Kg y 8 µg/Kg, respectivamente). También en la leche de oveja y cabra los límites para distintas versiones de Delvotest resultaron superiores (3 µg/Kg: Sierra y col., 2009a y 4 µg/Kg: Althaus y col., 2001).

Por último, para el Eclipse 100 se calcula un límite de detección de 3 µg/Kg de la amoxicilina, inferior al obtenido por Montero y col. (2005) cuando utilizan el método Eclipse 100 ov con leche de oveja (7 µg/Kg).

Comparando estos LD con los 4 µg/Kg establecido para la amoxicilina como Residuos (LMR) por la legislación Europea (Reglamento 37/2010/UE), resulta evidente que los métodos estudiados presentan una buena sensibilidad para este antibiótico, ya que son capaces de detectarla a concentraciones inferiores al LMR, lo que, en algunos casos, puede dar lugar a resultados “no conformes” en muestras de leche que contengan residuos por debajo de los límites legales.

Por otra parte, mediante la Ecuación IV, descrita en el apartado 3.5. de Materiales y Métodos, se estimaron las frecuencias de resultados positivos (FR) en los diferentes tiempos de refrigeración cuando se analizan muestras de leche adicionadas con amoxicilina a una concentración equivalente al límite de detección calculado en este estudio (Cuadro 37).

Cuadro 37. Efecto del tiempo de refrigeración y del azidiol sobre los resultados positivos (%) de los métodos microbiológicos en el análisis de muestras de leche con amoxicilina

Horas de refrigeración	0	24	48	72
BRT AiM				
Sin conservante	95	51	5	0
Azidiol	95	89	79	63
Delvotest MCS Accelerator				
Sin conservante	95	77	37	9
Azidiol	95	89	78	60
Eclipse 100				
Sin conservante	95	81	49	18
Azidiol	95	88	73	50

También, a partir de estos resultados y con la aplicación de la Ecuación VI, descrita también en Material y Métodos, se calcularon las pérdidas relativas de actividad antimicrobiana (PAA) para la amoxicilina, en muestras de leche sin conservante y con azidiol (Figura 42).

En el Cuadro 37 se aprecia que la frecuencia de resultados positivos disminuye cuando se emplean muestras de leche refrigeradas que contienen amoxicilina, tanto para las muestras sin conservante como para aquellas conservadas con azidiol. Además en todos los casos, la frecuencia de resultados positivos es más elevada para las muestras de leche conservadas con azidiol respecto a las muestras sin conservante. En consecuencia, como se observa en la Figura 42 las PAA aumentan al prolongar el tiempo de refrigeración y son mayores en las muestras de leche conservadas a 4 °C sin conservante.

Así, las PAA de la amoxicilina estimadas mediante los métodos microbiológicos en muestras de leche sin conservante a las 24 de horas de refrigeración están comprendidas entre el 15% (Eclipse 100) y 47% (BRT AiM), a las 48 horas entre 48% (Eclipse 100) y 94% (BRT AiM). Mientras que a las 72 horas de refrigeración, dichas pérdidas son muy elevadas oscilando entre 81% (Eclipse 100) y 100% (BRT AiM).

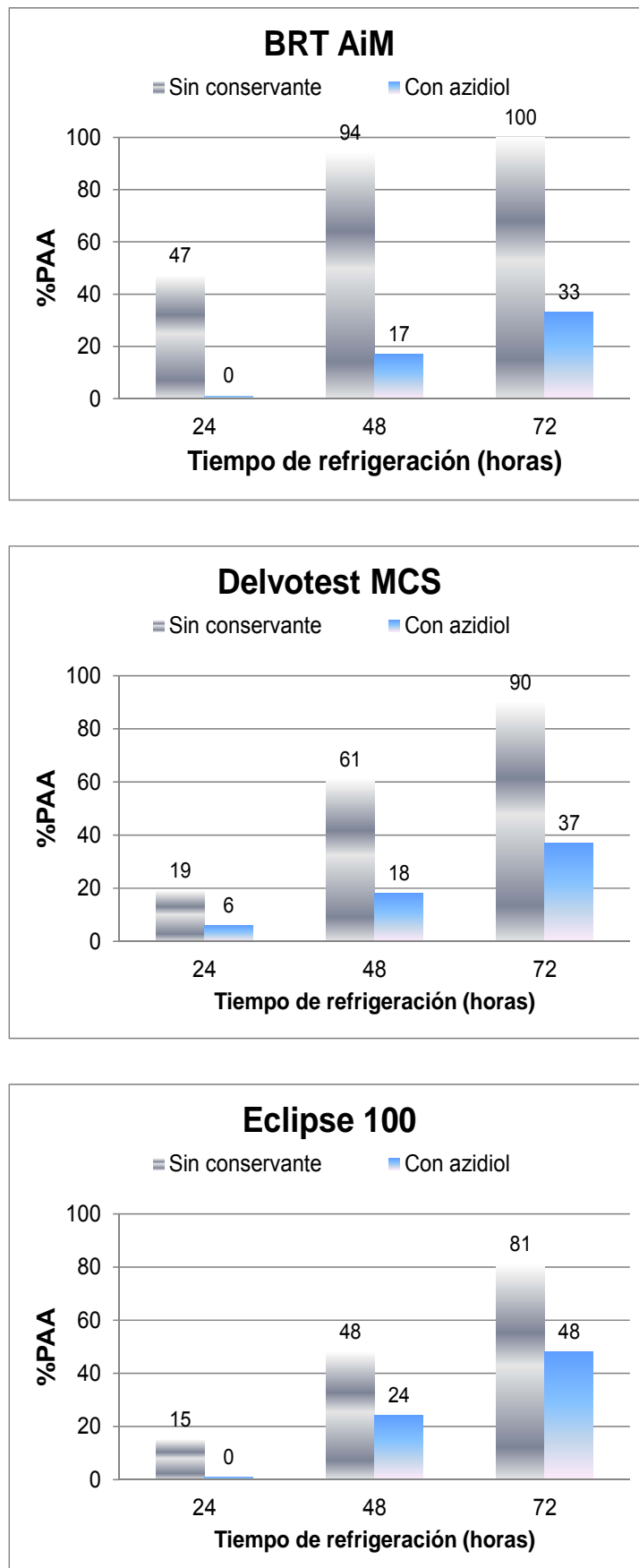


Figura 42. Efecto del tiempo de refrigeración sobre las pérdidas relativas de actividad antimicrobiana (PAA) de amoxicilina en la leche

Por el contrario, cuando las muestras de leche se conservan con azidiol, las pérdidas son menores, alcanzando los mayores porcentajes a las 72 horas de su almacenamiento a 4 °C con pérdidas del 33% (BRT AiM), 37% (Delvotest MCS Accelerator) y 48% (Eclipse 100).

Las menores pérdidas calculadas para las muestras con azidiol pueden atribuirse a que este conservante retrasa el crecimiento microbiano en la leche y por tanto la posible liberación por parte de los microorganismos de enzimas (por ejemplo betalactamasas) que actúen como factor de degradación de los antibióticos tal y como señalan Guay y col. (1987) al analizar la influencia de las betalactamasas sobre la presencia de penicilina G en la leche.

Otra explicación a estas menores pérdidas en muestras de leche con conservante, podría estar relacionado con la presencia de cloranfenicol en la composición del azidiol, ya que este antimicrobiano puede aumentar ligeramente la sensibilidad de los métodos microbiológicos a algunos antibióticos, tal como se señalan en un informe técnico realizado por Zeu-Inmunotec sobre el método Eclipse 100 (Zeu-Inmunotec, 2008). Por ello, con la presencia de azidiol en las muestras de leche la frecuencia de resultados positivos (FR) a una misma concentración es más elevada en aquellas sin conservante, y como la PAA se calcula a partir de los valores de FR estas pérdidas son inferiores cuando las muestras se refrigeran con azidiol.

Por otra parte, cuando se compara el efecto de la adición de azidiol sobre la PAA para cada uno de los tres métodos microbiológicos utilizados, se observa que el azidiol produce menores pérdidas en los métodos BRT AiM y Delvotest MCS Accelerator, comparado con el Eclipse 100 que presenta mayores porcentajes de PAA. Este comportamiento diferente de los métodos puede atribuirse a diferencias en el efecto del cloranfenicol presente en el azidiol sobre la sensibilidad de los métodos.

Es importante resaltar que en el caso que sea necesario refrigerar las muestras de leche resulta conveniente mantenerlas conservadas con azidiol, ya que las pérdidas relativas de actividad antimicrobiana son menores, y por tanto los resultados serán más reproducibles entre los diferentes tiempos de refrigeración.

Con respecto a los estudios realizados sobre la influencia de la refrigeración de leche con antibióticos, se debe destacar que la gran mayoría de trabajos consultados determinan la degradación cuantitativa de las moléculas de antimicrobianos y no las pérdidas de actividad antimicrobiana, motivo por el cual se hace difícil la comparación de resultados.

Aunque a modo informativo, hay que señalar que Riediker y col. (2004), estudiaron la estabilidad de 4 betalactámicos (amoxicilina, cloxacilina, oxacilina y penicilina G) en muestras conservadas a 4 °C, mediante LC-ESI-MS/MS encontrando degradaciones superiores al 50% para los 4 analitos tras 7 días de conservación a una temperatura de 4 °C, y una degradación total a los 28 días de almacenamiento.

A su vez, Roca y col. (2008) cuando analiza la degradación de la amoxicilina mediante técnica de cromatografía LC MS-MS señalan una degradación del 24% a las 72 horas de almacenamiento a 4 °C, porcentaje similar al calculado para el método cualitativo BRT AiM (25%).

En el caso de los métodos microbiológicos, los estudios encontrados son muy reducidos, Borràs y col. (2009) evaluaron la influencia de los factores metodológicos relacionados con la toma de muestras de la leche (azidiol y refrigeración) sobre la sensibilidad (al LMR) de los métodos BRT AiM, Delvotest MCS Accelerator y Eclipse 100 para 8 antibióticos betalactámicos, entre ellos la amoxicilina, ampicilina y penicilina G. Dichos autores obtuvieron en todos los casos sensibilidades del 100% durante una semana de refrigeración para las muestras conservadas con azidiol y menores valores para las muestras sin conservante. Se debe destacar que los métodos empleados presentan límites de detección inferiores a los LMRs por lo tanto las posibles disminuciones en la concentración de estos antibióticos no afectan a la respuesta “dicotómica” de los métodos, además en el citado estudio se trabajó una concentración fija equivalente al LMR lo que hace imposible cuantificarlas pérdidas de actividad antimicrobiana.

3.1.2. Ampicilina

En el Cuadro 38 se exponen los principales parámetros estadísticos obtenidos del estudio de los efectos del conservante, tiempo de refrigeración y su interacción sobre la curva dosis-respuesta de la ampicilina en muestras de leche analizadas con los métodos microbiológicos BRT AiM, Delvotest MCS Accelerator y Eclipse 100.

En dicho Cuadro se observa que el tiempo de refrigeración y la interacción entre el conservante y el tiempo de refrigeración afecta en forma significativa ($p < 0,05$) a la respuesta de todos los métodos cuando se utilizan muestras de leche con ampicilina, a excepción del Eclipse 100 cuya respuesta no está afectada por el tiempo de refrigeración. En cuanto a la presencia de azidiol solo presenta efecto significativo sobre la respuesta del método BRT AiM.

Cuadro 38. Valores de chi-cuadrado (χ^2) y probabilidad (p) de los factores de variación de la respuesta de los métodos microbiológicos para la detección de ampicilina en la leche

Método	Concentración (C)		Refrigeración (R)		Azidiol (A)		R*A	
	χ^2	P	χ^2	P	χ^2	P	χ^2	P
BRT AiM	878,41	0,000	19,60	0,000	7,75	0,005	85,77	0,000
Delvotest MCS ¹	504,21	0,000	6,06	0,013	0,04	0,836	6,67	0,009
Eclipse 100	1015,75	0,000	0,000	1,000	0,321	0,571	14,94	0,000

¹Delvotest MCS Accelerator

Las ecuaciones logísticas que expresan la frecuencia de resultados positivos de los métodos microbiológicos para las muestras de leche con ampicilina en función de aquellos factores que resultan significativos para cada método se presentan en el Cuadro 39, junto a los parámetros estadísticos obtenidos al utilizar el test de bondad de ajuste.

Cuadro 39. Ecuaciones de predicción de la respuesta de los métodos microbiológicos para la detección de ampicilina en la leche

Método	Logist [P]= $\beta_0 + \beta_1 [C] + \sum \beta_2 [R] + \beta_2 [A] + \sum \beta_{23} [R]_i^* [A]$	Test de bondad del ajuste	
		χ^2	P
BRT AiM	$L = -16,8085 + 13,2414C - 0,0558R + 2,2559A - 0,2005R^*A$	1,703	0,636
Delvotest MCS ¹	$L = -4,9307 + 2,7891C - 0,0135R - 0,0140R^*A$	4,469	0,199
Eclipse 100	$L = -32,4765 + 17,5509C - 0,0671R^*A$	4,004	0,146

¹Delvotest MCS Accelerator; L: $\ln(\text{Probabilidad (+)}/1 - \text{Probabilidad (+)})$; C: concentración de ampicilina; R: tiempo de refrigeración (0, 24, 48 o 72 horas); A: azidiol (sin conservante=1 y con azidiol=0).

En el Cuadro 39 se observa que los valores de los coeficientes β_1 son más elevados para los métodos BRT AiM ($\beta_1 = 13,2414$) y Eclipse 100 ($\beta_1 = 17,5509$) en comparación con el método Delvotest MCS Accelerator ($\beta_1 = 2,7891$), señalando una mayor sensibilidad para la detección de residuos de ampicilina en leche por parte de los dos primeros métodos en comparación con el último.

Con el propósito de visualizar el efecto que produce el tiempo de refrigeración a 4 °C y la presencia de conservante sobre la curva dosis-respuesta de muestras de leche con ampicilina, se ha elaborado la Figura 43.

A partir de la Figura se pone en evidencia que un incremento en el tiempo de refrigeración produce un desplazamiento de las curvas dosis-respuesta de la ampicilina hacia mayores concentraciones (desplazamiento hacia la derecha) debido a los valores negativos de los coeficientes β_2 para el BRT AiM ($\beta_2 = -0,05584$) y Eclipse 100 ($\beta_2 = -0,01348$) que se presentan en el Cuadro 38, similar al comportamiento que mostró la amoxicilina (Cuadro 34). Con respecto a las interacciones entre R*A, los tres métodos obtienen coeficientes con signo negativo, (BRT AiM $\beta_{23} = -0,20055$, Delvotest $\beta_{23} = -0,01402$, Eclipse 100 $\beta_{23} = -0,06705$) poniendo de manifiesto un comportamiento diferente cuando las muestras de leche contienen azidol en comparación con las muestras de leche sin conservante.

Por ello, en las muestras de leche con azidol, el desplazamiento de las curvas dosis-respuesta es menor y la frecuencia de resultados positivos en cada método microbiológico se mantiene más próxima a la observada para tiempo cero (sin refrigerar). Hay que destacar que en el método Eclipse 100 no se producen cambios en los resultados por la refrigeración de las muestras cuando se les añade azidol, por eso el tiempo de refrigeración en este método no es significativo (Cuadro 38).

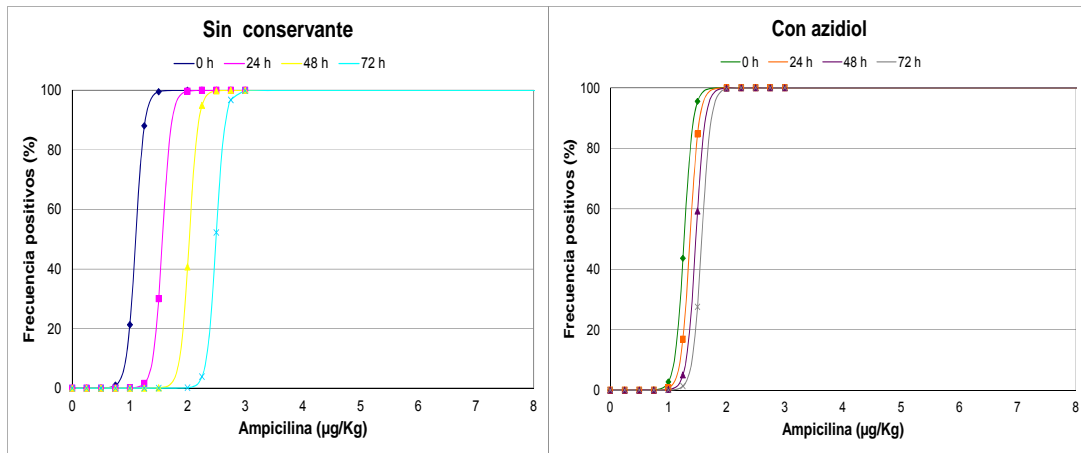
Debido al efecto significativo que presenta el tiempo de refrigeración y/o la interacción entre R*A sobre las frecuencias de resultados positivos a los métodos, se ha analizado el efecto para cada uno de los tiempo de análisis (24, 48 y 72 horas) con respecto a la frecuencia de resultados positivos obtenida a tiempo cero (Cuadro 40).

Se puede observar que los factores tiempo de refrigeración, azidol y la interacción entre ambos tienen un efecto significativo sobre la respuesta del método BRT AiM a las 24 horas de refrigeración.

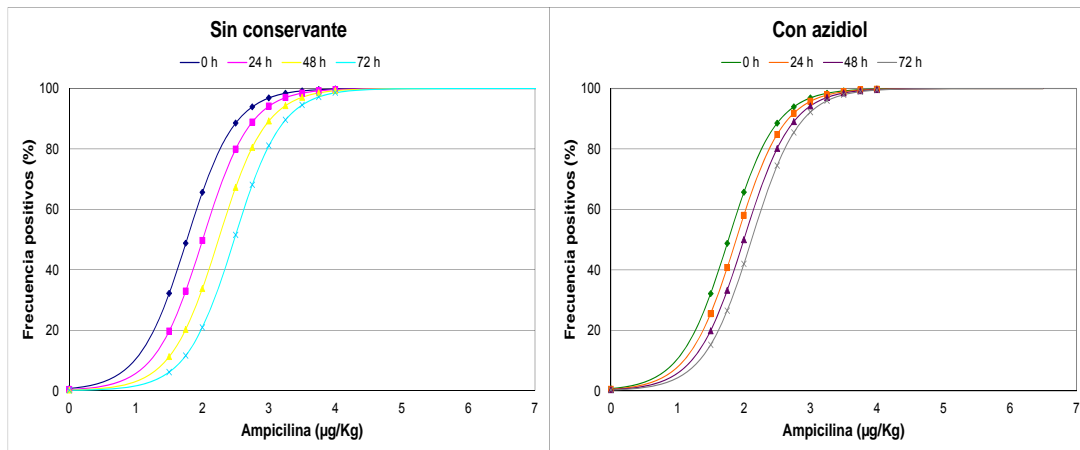
En cambio, en el método Delvotest MCS Accelerator solamente resulta significativo el tiempo de refrigeración y en el Eclipse 100 la interacción entre el tiempo de refrigeración y al azidol, sucediendo en ambos métodos a las 72 horas de conservación.

Con el fin de establecer desde un punto de vista práctico los protocolos de trabajo en los laboratorios de control, se estimaron los porcentajes de pérdidas relativas de actividad antimicrobiana (PAA) al refrigerar las muestras de leche con ampicilina durante 3 días (72 horas). Para obtener estas pérdidas, en primer lugar se calcularon los límites de detección (concentración que produce 95% de resultados positivos) en muestras de leche sin conservante y no refrigeradas para cada método a partir de las ecuaciones de predicción del Cuadro 38.

BRT AiM



Delvotest MCS



Eclipse 100

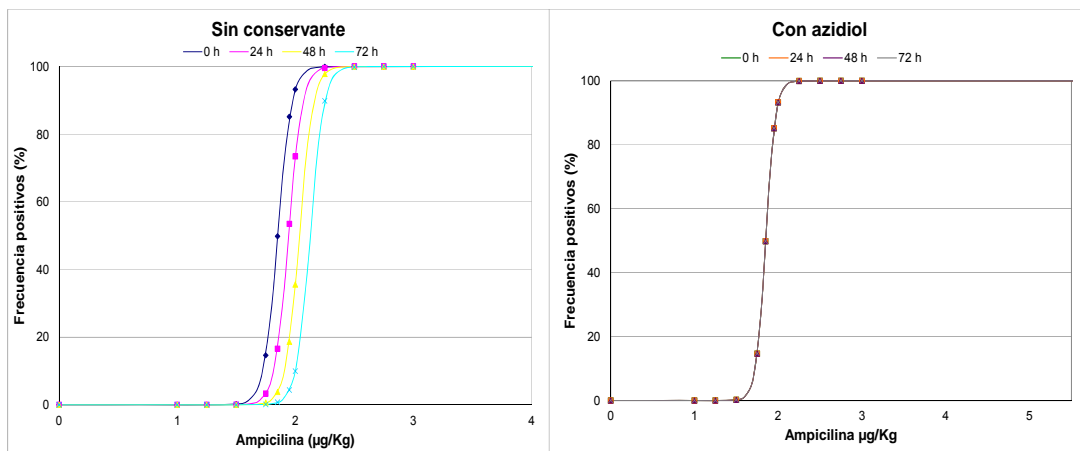


Figura 43. Efecto del conservante y del tiempo de refrigeración de las muestras de leche sobre la curva dosis-respuesta de los métodos microbiológicos para la ampicilina

Cuadro 40. Efecto del tiempo de refrigeración, azidiol y la interacción entre tiempo de refrigeración y azidiol sobre los métodos microbiológicos en el análisis de muestras de leche con ampicilina

Horas de refrigeración	Método	Refrigeración (R)		Azidiol (A)		R*A	
		χ^2	p	χ^2	p	χ^2	p
0-24	BRT AiM	13,336	0,000	26,584	0,000	24,006	0,000
	Delvotest MCS ¹	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	1,000
	Eclipse 100	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	1,000
0-48	BRT AiM	65,712	0,000	65,712	0,000	25,175	0,000
	Delvotest MCS ¹	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	1,000
	Eclipse 100	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	1,000
0-72	BRT AiM	58,607	0,000	58,607	0,000	85,961	0,000
	Delvotest MCS ¹	3,929	0,047	0,000	1,000	1,673	0,195
	Eclipse 100	0,000	1,000	0,000	1,000	8,985	0,002

Delvotest MCS Accelerator

Los límites de detección de la ampicilina para los métodos Delvotest MCS Accelerator (3 $\mu\text{g/Kg}$) y Eclipse 100 (2 $\mu\text{g/Kg}$) calculados en este trabajo son superiores a los calculados para el método BRT AiM (1,5 $\mu\text{g/Kg}$). En todos los casos, resultan menores que los indicados por los fabricantes, quienes señalan niveles de detección de 5 $\mu\text{g/Kg}$ (Delvotest MCS Accelerator), 4 $\mu\text{g/Kg}$ (Eclipse 100) y 2-3 $\mu\text{g/Kg}$ (BRT AiM). Estas discrepancias entre límites podrían atribuirse a las diferentes metodologías utilizadas para su cálculo estadístico, ya que en el presente estudio se utilizó un modelo de regresión logística.

Los límites de detección calculados para el Delvotest MCS Accelerator son similares a los señalados por Luitz y col. (1996) para otra versión de Delvotest SP. Por el contrario, otros autores obtuvieron límites superiores entre 4 y 6 $\mu\text{g/Kg}$ (Gist Brocades, 1997; Honkanen y Reybroeck, 1995; Lacroix, 1995; Charm y Ruth 1993) cuando analizan muestras de leche con ampicilina.

Respecto al método BRT AiM, los límites de detección calculados por diferentes autores (Charm y Ruth, 1993; Frank 1995; Heeschen, 1993; Heeschen y Büthgen, 1995 y Zorraquino, 1998); son superiores al nivel de 1,5 $\mu\text{g/Kg}$ obtenido en este trabajo para la versión BRT AiM MRL. Lo mismo ocurre con leche de oveja (Althaus y col., 2001: 6 $\mu\text{g/Kg}$) y leche de cabra (Sierra y col., 2010a: 3 $\mu\text{g/Kg}$).

En el caso del Eclipse 100, Sierra y col. (2009a) a partir de muestras de leche de cabra calcularon para la ampicilina 5 µg/Kg, límite superior al calculado en este estudio (2 µg/Kg).

Cuando se comparan los valores de los límites de detección de la ampicilina con el LMR establecido por la UE (4 µg/Kg), se observa que los métodos Delvotest MCS Accelerator (3 µg/Kg) y Eclipse 100 (2 µg/Kg) detectan este antibiótico a niveles cercanos a su LMR, mientras que el método BRT AiM (1,5 µg/Kg) presenta una mayor sensibilidad, pudiendo dar lugar a resultados “falsos violativos”. También Sierra y col. (2009a) obtuvieron el mismo límite de detección cuando analizan residuos de amoxicilina en leche de cabra con el método Delvotest MCS (3 µg/Kg).

Con el límite de detección calculado para la ampicilina en cada uno de los métodos microbiológicos y haciendo uso de la Ecuación V descrita anteriormente, se calcularon las frecuencias de resultados positivos de cada método para los distintos tiempos de refrigeración a 4 °C, tanto para muestras de leche sin conservante como con azidiol (Cuadro 41). Una vez calculada la frecuencia de resultados positivos se aplicó la Ecuación III para estimar las pérdidas de actividad antimicrobiana (PAA) que se han representado en la Figura 44.

A partir del Cuadro 41 y de la Figura 44 se puede concluir que los resultados positivos de las muestras sin conservante disminuyen con el tiempo de refrigeración, mientras que las frecuencias de resultados positivos de las muestras conservadas con azidiol presentan leves disminuciones a partir de las 72 horas de conservación a 4 °C. Por lo tanto las pérdidas de actividad antimicrobiana de la ampicilina, al igual que la amoxicilina son más elevadas en las muestras sin conservante que en aquellas que contenían azidiol.

Hay que destacar que en el método BRT AiM las muestras de leche con ampicilina y refrigeradas sin conservante a las 24 horas presentan una PAA de aproximadamente el 100%. En cambio, las muestras con ampicilina que contienen azidiol obtienen PAA muy bajas, incluso cuando se conservan a 4 °C durante 72 horas.

En resumen, se puede establecer que, los laboratorios de análisis deben adicionar azidiol como conservante en caso que tengan que refrigerar las muestras de leche por un tiempo superior a las 24 horas para el análisis de inhibidores con métodos microbiológicos. De lo contrario, los residuos de ampicilina podrían llegar a no ser detectados por estos métodos, debido a la pérdida de actividad antimicrobiana.

Cuadro 41. Efecto del tiempo de refrigeración y del azidiol sobre los resultados positivos (%) de los métodos microbiológicos en el análisis de muestras de leche con ampicilina

Horas de refrigeración	0	24	48	72
BRT AiM				
Sin conservante	95	4	0	0
Azidiol	95	95	92	76
Delvotest MCS Accelerator				
Sin conservante	95	91	84	72
Azidiol	95	93	91	88
Eclipse 100				
Sin conservante	95	79	43	13
Azidiol	95	95	95	95

Respecto a la comparación de los resultados de pérdidas de actividad antimicrobiana obtenidos en este estudio (Figura 44) con los obtenidos por otros autores es difícil poder establecer comparaciones debido a que los estudios encontrado evalúan la degradación de moléculas de antibióticos mediante técnicas cuantitativas de cromatografía LC y no mediante métodos microbiológicos de respuesta cualitativa. A modo orientativo se puede indicar que Wiese y Martín (1989b) no encontraron pérdidas significativas cuando muestras fortificadas con 20 µg/kg de ampicilina se refrigeran a 4 y -70 °C durante 6 días de almacenamiento.

Tampoco Schenk y col. (2000) indicaron pérdidas significativas para muestras de leche con ampicilina transcurridos los 6 días de su conservación en frío, utilizando LC-FL para la cuantificación.

Por el contrario, Roca y col. (2009) obtuvieron en muestras de leche con ampicilina a una concentración equivalente a 4 µg/Kg, y que fueron refrigeradas durante una semana unos porcentajes de degradación del 29,2%.

En métodos microbiológicos y leche de oveja Borràs y col. (2009) calculan la sensibilidad al LMR de la ampicilina para los métodos CMT Copan, Delvotest MCS Accelerator y Eclipse 100 durante una semana de refrigeración, encontrando una disminución de la sensibilidad en el CMT Copan y Eclipse 100 del 37,5% y Delvotest MCS del 56,3% a las 24 horas de refrigeración

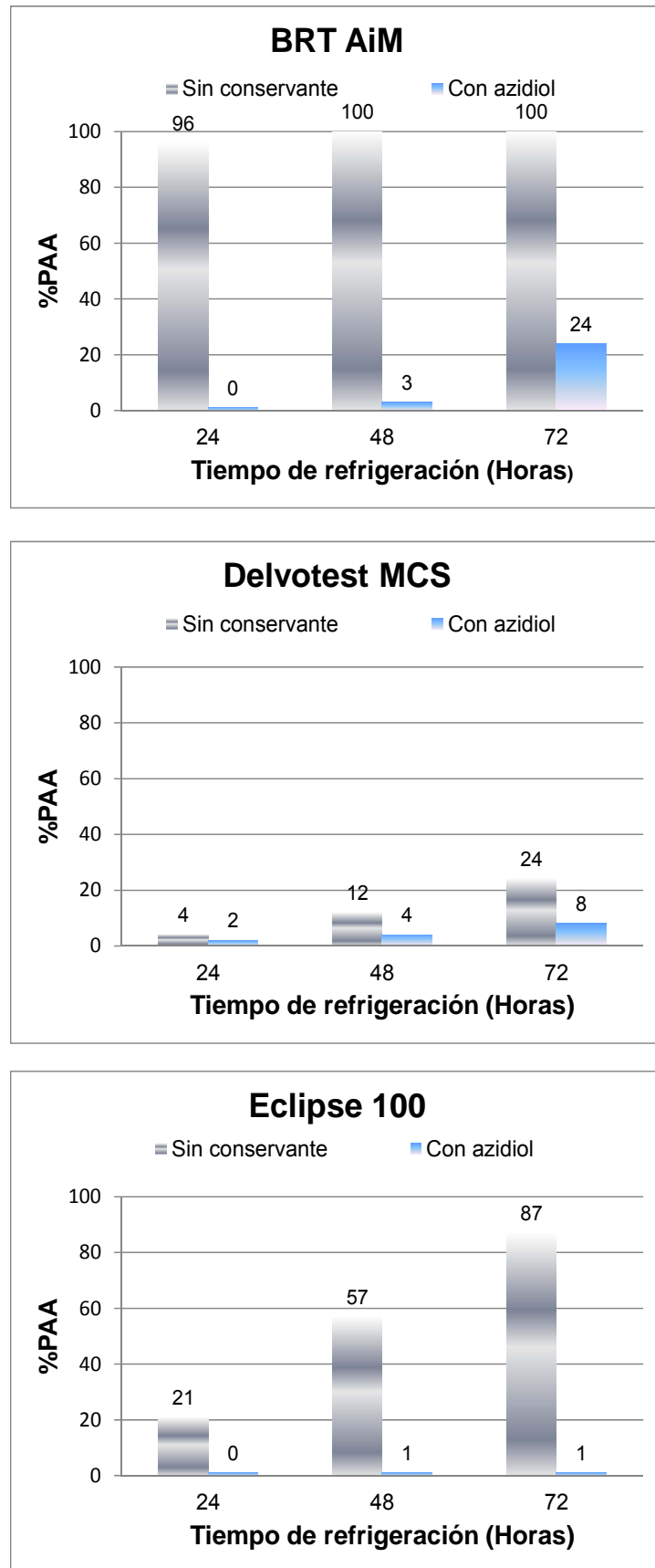


Figura 44. Efecto del tiempo de refrigeración sobre las pérdidas relativas de actividad antimicrobiana (PAA) de ampicilina en la leche

3.1.3. Penicilina G

En cuanto a la penicilina G en el Cuadro 42 se resumen los principales resultados del estudio del efecto del conservante, tiempo de refrigeración y su interacción sobre la respuesta de los métodos microbiológicos.

Se observa en el Cuadro que la concentración de penicilina G, el tiempo de refrigeración (24, 48 y 72 horas) y la interacción entre el tiempo de refrigeración y el azidiol es significativa ($p < 0,001$). Este hecho pone de manifiesto que la respuesta de estos métodos utilizados en la industria láctea se modifica debido a la refrigeración de las muestras de leche, y además esta variación puede ser diferente cuando a las muestras de leche se les añade azidiol. Por el contrario, el efecto principal del azidiol como conservante no es significativo ($p > 0,001$) en ninguno de los casos.

Cuadro 42. Valores de chi-cuadrado (χ^2) y probabilidad (p) de los factores de variación de la respuesta de los métodos microbiológicos para la detección de penicilina G en la leche

Método	Concentración (C)		Refrigeración (R)		Azidiol (A)		R*A	
	χ^2	p	χ^2	p	χ^2	p	χ^2	p
BRT AiM	964,44	0,000	27,87	0,000	1,11	0,290	30,42	0,000
Delvotest MCS ¹	810,12	0,000	112,55	0,000	0,000	1,000	71,44	0,000
Eclipse 100	756,35	0,000	131,41	0,000	0,201	0,653	63,03	0,000

¹Delvotest MCS Accelerator

Las ecuaciones de predicción obtenidas cuando los tres métodos de cribado se utilizan en muestras de leche con penicilina G se presentan en el Cuadro 43. Los valores de los coeficiente β_1 señalan un aumento en la frecuencia de resultados positivos en la medida que aumenta la concentración de penicilina G en las muestras de leche. Los elevados valores del coeficiente β_1 observados para los tres métodos señalan la buena sensibilidad del *G. stearothermophilus* utilizado como microorganismo de prueba en estos métodos microbiológicos a esta molécula.

Como en los otros antibióticos betalactámicos estudiados los coeficiente β_2 y β_{23} de las ecuaciones presentan signo negativo, por ello los resultados positivos disminuyen en la medida que se prolonga el tiempo de refrigeración. Además, el efecto de la refrigeración es menos marcado cuando las muestras contienen azidiol como conservante (valores negativos de los coeficientes β_{23}).

Cuadro 43. Ecuaciones de predicción de la respuesta de los métodos microbiológicos para la detección de penicilina G en la leche

Método	Logist [P]= $\beta_0 + \beta_1 [C] + \sum \beta_2 [R] + \beta_3 [A] + \sum \beta_{23} [R]_i * [A]$	Test de bondad del ajuste	
		χ^2	p
BRT AiM	$L = -21,2913 + 19,9409C - 0,0545R - 0,0507R * A$	2,094	0,553
Delvotest MCS ¹	$L = -7,5348 + 10,0412C - 0,1269R - 0,0822R * A$	4,153	0,245
Eclipse 100	$L = -11,6628 + 11,5641C - 0,1192R - 0,0777R * A$	1,108	0,760

¹Delvotest MCS Accelerator; L: $\ln(\text{Probabilidad (+)}/1 - \text{Probabilidad (+)})$; C: concentración de penicilina G; R: tiempo de refrigeración (0, 24, 48 o 72 horas); A: azidiol (sin conservante=1 y con azidiol=0).

El ajuste entre las frecuencias de resultados positivos medidos y los valores estimados por el modelo logístico son buenos para los tres métodos, puesto que los valores de p procedentes del test bondad de ajuste resultan superiores a 0,05, lo que indica que no se encontraron diferencias significativas.

La Figura 45 muestra las curvas dosis-respuesta construidas a partir del modelo logístico. Igual que en los casos anteriores, se presentan dos curvas por cada método, una para las muestras sin conservante y otra para aquellas conservadas con azidiol.

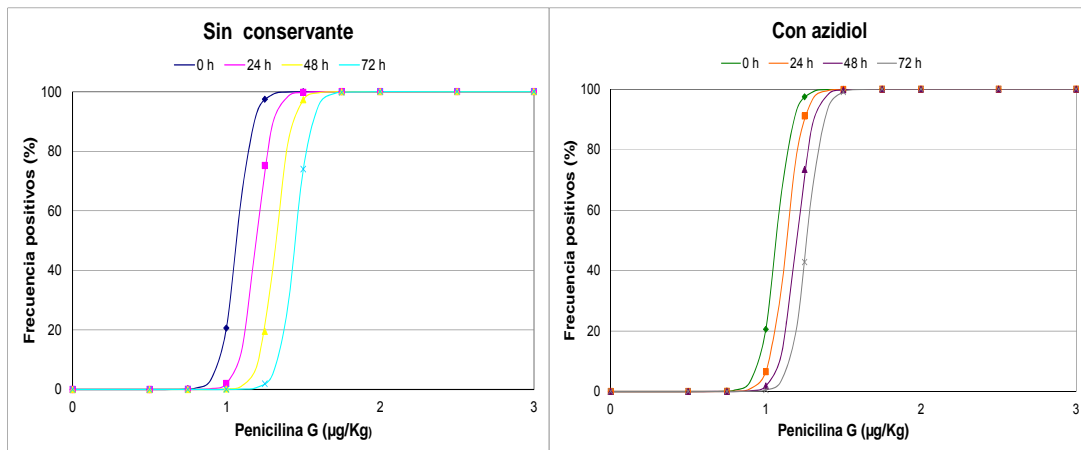
Un aumento en el tiempo de refrigeración de las muestras de leche con penicilina G, tanto para muestras sin conservante como aquellas con azidiol, produce un desplazamiento de las curvas dosis-respuesta hacia mayores concentraciones de penicilina (desplazamiento hacia la derecha).

De esta forma para obtener las mismas frecuencias de resultados positivos en muestras refrigeradas 24, 48 o 72 horas que las obtenidas en muestras sin refrigerar (0 horas) se necesitan mayores concentraciones de penicilina G a medida que se prolonga el tiempo de análisis.

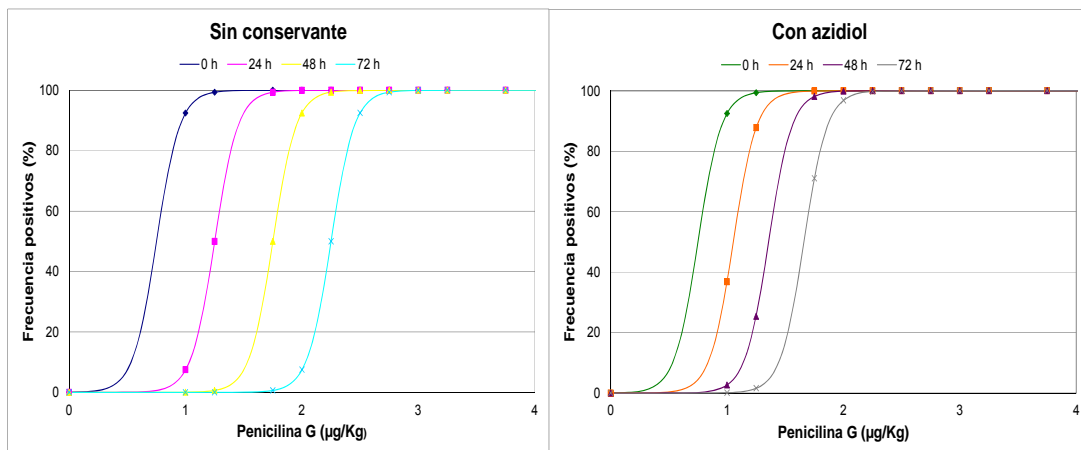
Para el caso de leche con azidiol, las frecuencias de resultados positivos son más elevados a medida que aumento el tiempo de almacenamiento que en caso de no utilizar este conservante, de ahí el efecto significativo observado para la interacción (R*A).

En este caso también se realizó un análisis estadístico para evaluar el efecto del tiempo de refrigeración a diferentes intervalos de tiempo (0-24, 0-48 y 0-72 horas) para aquellos parámetros que resultaron significativos (tiempo de refrigeración y su interacción con azidiol), cuyos resultados se han expuesto en el Cuadro 44.

BRT AiM



Delvotest MCS



Eclipse 100

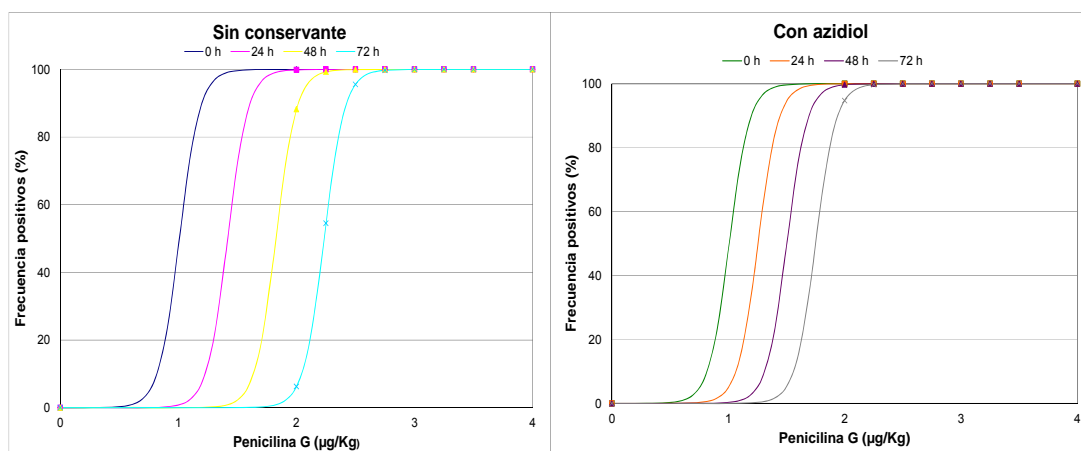


Figura 45. Efecto del conservante y tiempo de refrigeración de las muestras de leche sobre la curva dosis-respuesta de los métodos microbiológicos para la penicilina G

Cuadro 44. Efecto del tiempo de refrigeración y la interacción entre tiempo de refrigeración y azidiol sobre los métodos microbiológicos en el análisis de muestras de leche con penicilina G

Horas de refrigeración	Método	Refrigeración (R)		R*A	
		χ^2	p	χ^2	p
0-24	BRT AiM	0,000	1,000	0,000	1,000
	Delvotest MCS ¹	0,688	0,406	14,041	0,000
	Eclipse 100	0,000	1,000	0,000	1,000
0-48	BRT AiM	48,755	0,000	432,75	0,000
	Delvotest MCS ¹	13,14	0,000	45,77	0,000
	Eclipse 100	0,000	1,000	0,000	1,000
0-72	BRT AiM	32,755	0,000	78,47	0,000
	Delvotest MCS ¹	139,296	0,000	45,753	0,000
	Eclipse 100	180,08	0,000	50,85	0,000

¹Delvotest MCS Accelerator

En cuanto al efecto del tiempo de refrigeración, las frecuencias de resultados positivos en los métodos BRT AiM y Delvotest Accelerator en leche con penicilina presentan diferencias estadísticas significativas a partir de las 48 horas de conservación, mientras que en caso del Eclipse 100, las frecuencias de resultados positivos se modifican solo a las 72 horas de refrigeración. Por su parte, la interacción R*A es significativa para el Delvotest MCS Accelerator a partir de las 24 horas, en el BRT AiM a las 48 horas y en Eclipse 100 a las 72 horas.

Por ello, en caso de que las muestras de leche tengan que permanecer refrigeradas en los laboratorios antes de ser analizadas con los métodos microbiológicos, se recomienda como en casos anteriores adicionar azidiol, ya que los resultados son similares a los obtenidos a tiempo cero, es decir, en el momento de preparar las disoluciones.

De la misma manera que se procedió en los estudios anteriores, se han estimado las pérdidas relativas de actividad antimicrobiana de la penicilina G (PAA) en muestras de leche sin conservante y con azidiol a lo largo de tres días (72 horas) de almacenamiento a 4 °C.

Para ello, se han obtenido los límites de detección de los diferentes métodos en muestras sin conservante y que no habían sido refrigeradas (BRT AiM: 1,2 µg/Kg; Delvotest MCS Accelerator: 1,0 µg/Kg y Eclipse 100: 1,3 µg/Kg). Estos límites son inferiores a los establecidos por los fabricantes para los métodos BRT AiM (2-3 µg/Kg) y Eclipse 100 (4 µg/Kg), mientras que en el método Delvotest MCS Accelerator, el límite de detección calculado se encuentra dentro del intervalo indicado por DSM Food (1-2 µg/Kg).

Por otra parte, el límite de detección obtenido para la penicilina G con el método BRT AiM (1,21 µg/Kg) es similar a los obtenidos por Heeschen y Blüthgen (1995), a los señalados por Frank (1995) y Althaus y col. (2001) en leche de oveja y Sierra y col. (2010a) en leche de cabra. Por su parte, Zorraquino y col. (1998) y Zaadhof y col. (1997) obtienen para este método un límite superior (2-3 µg/Kg), mientras que Charm y Rhut (1993), Heeschen (1993) y Jaskch (1988) obtienen valores más elevados que el calculado en este estudio (7 a 10 µg/Kg).

Otros autores, calculan límites de detección más elevados para la penicilina G, cuando emplean diferentes versiones de Delvotest. En general, los límites están entre 2 y 3 µg/Kg (Charm y Ruth, 1993; Honkanen y Reybroeck, 1995; Lacroix 1995; Sischo, 1996; Gist Brocades, 1997; Zaadhof y col., 1997; Sierra y col., 2009a). En muestras de leche de oveja Althaus y col. (2001) calcularon un límite de detección de 1,0 µg/kg en el método Delvotest SP similar al determinado por este estudio (1,4 µg/Kg) para el Delvotest MCS Accelerator.

Por último, el límite de detección del Eclipse 100 (1,3 µg/Kg) resulta inferior al calculado por Montero y col. (2005) al utilizar otra versión del método (Eclipse 100 ov) con muestras de leche de oveja (5 µg/Kg) y Sierra y col. (2009a) en leche de cabra (5 µg/Kg).

Cuando se comparan los límites obtenidos en este trabajo con el LMR de la penicilina G en leche (4 µg/Kg) resulta evidente que, al igual que en los otros betalactámicos, los límites son mucho menores que el LMR establecido por la UE.

En cuanto a los límites de detección (LD) de los métodos microbiológicos ensayados para la amoxicilina, ampicilina y penicilina G sería conveniente que las casas fabricantes acercaran estos límites al LMR para evitar sanciones no procedentes a los ganaderos, ya que estos límites resultaron menores en todos los casos a los LMRs.

Después de obtener los límites de detección de la penicilina G, se han calculado para estos valores, las frecuencias de resultados positivos en leche sin conservante y con azidiol para los diferentes tiempos de refrigeración (Cuadro 45) y los porcentajes de pérdidas de actividad antimicrobiana (PPA) de la penicilina G (Figura 46).

Cuadro 45. Efecto del tiempo de refrigeración y del azidiol sobre los resultados positivos (%) de los métodos microbiológicos en el análisis de muestras de leche con penicilina G

Horas de refrigeración	0	24	48	72
BRT AiM				
Sin conservante	95	58	10	1
Azidiol	95	82	55	25
Delvotest MCS Accelerator				
Sin conservante	95	11	0	0
Azidiol	95	47	4	0
Eclipse 100				
Sin conservante	95	14	0	0
Azidiol	95	51	6	0

Para los tres métodos se observa que las frecuencias de resultados positivos disminuyen en la medida que se prolonga el tiempo de refrigeración de las muestras de leche. Además, para cada método, las frecuencias de resultados positivos son más elevadas cuando se utiliza azidiol que en caso de no emplear conservante.

La penicilina G presenta mayores porcentajes de PAA que la amoxicilina (Figura 42) y ampicilina (Figura 44), tanto para las muestras sin conservante como para aquellas con azidiol. Por ello, se puede establecer que la actividad antimicrobiana de este betalactámico disminuye en mayor medida que en los casos de amoxicilina y ampicilina, siendo estas moléculas más estables al almacenamiento.

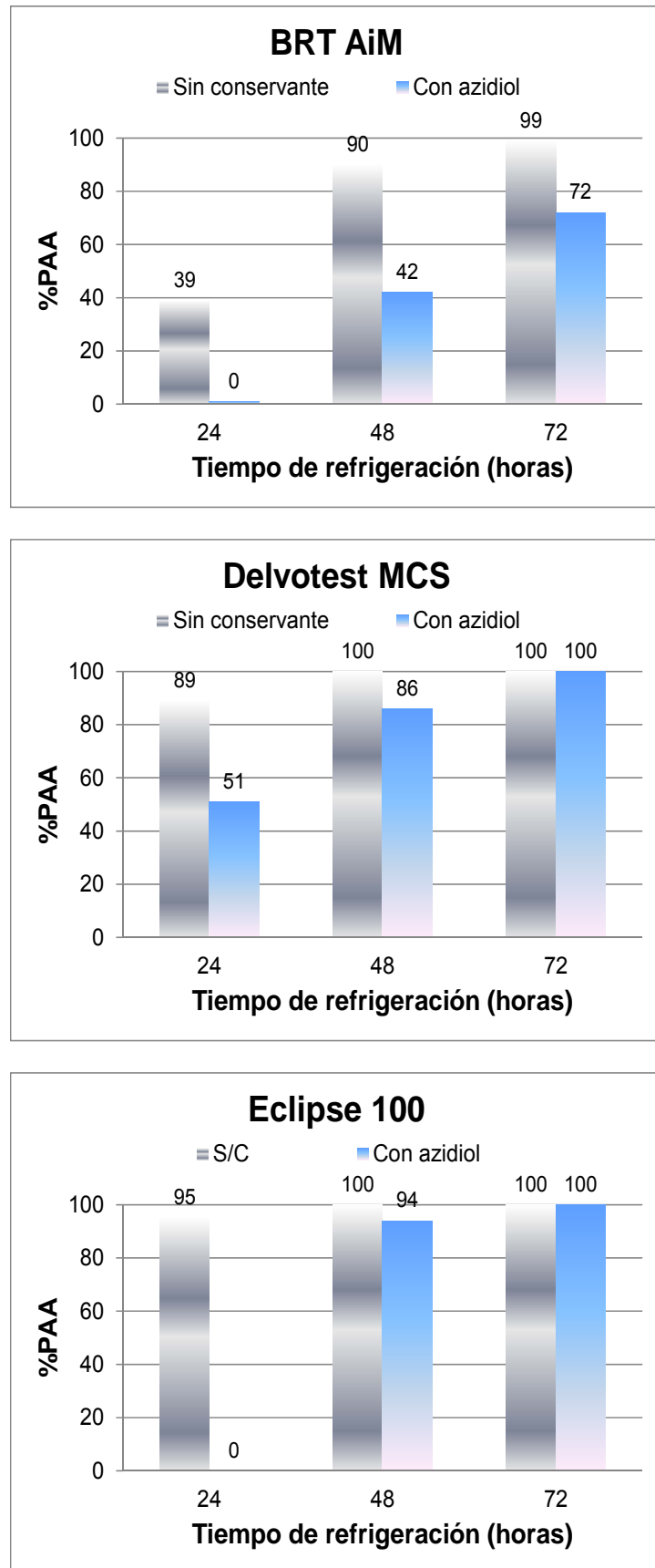


Figura 46. Efecto del tiempo de refrigeración sobre las pérdidas relativas de actividad antimicrobiana (PAA) de penicilina G en la leche

Para muestras sin conservante, las pérdidas son muy elevadas (entre el 90 y el 100%) cuando las muestras se analizan a las 48 horas desde su preparación (0 horas). De forma similar, las muestras con azidiol presentan pérdidas elevadas, 86 y 94%, respectivamente. Pero hay que destacar que en el método BRT AiM las PAA de la penicilina G fueron menos elevadas (42%), hasta incluso a los 3 días de almacenamiento (72%).

Esto puede deberse al hecho de que la respuesta de los métodos Delvotest MCS Accelerator y Eclipse 100 se basa en el cambio de color del indicador púrpura de bromocresol debido a una reacción ácido-base y que este cambio podría modificarse por la evolución del pH de las muestras de leche durante la refrigeración.

Por el contrario, la respuesta del método BRT AiM se basa en una reacción oxido-reducción utilizando indicador negro brillante, por lo que su respuesta se vería menos afectada por los cambios de pH.

En cuanto al efecto de la refrigeración de la penicilina G, la mayor parte de los trabajos han sido realizados mediante técnicas de cuantificación, por ejemplo Wiese y Martín (1989) obtuvieron concentraciones constantes de penicilina G en muestras de leche fortificadas con 20 y 100 µg/kg después de mantenerlas en refrigeración durante más de 6 días.

En cambio Haagsma (1993) indicó que aproximadamente el 60% de penicilina G en leche se destruye dentro de las 48 h de conservación a 2 °C, y que este valor se incrementa hasta el 75% cuando la temperatura de conservación empleada es de 22 °C.

También, Roca y col. (2008) mediante técnicas de HPLC evaluaron las pérdidas de penicilina G al LMR (4 µg/Kg) cuando las muestras de leche se almacenan a 4 °C, señalando una degradación del 21,4% después de 72 horas de conservación.

3.2. Oxitetraciclina

El estudio estadístico para evaluar los efectos de los factores de variación (concentración, tiempo de refrigeración, conservante, interacción entre tiempo de refrigeración y conservante) sobre la respuesta de los métodos BRT AiM, Delvotest MCS Accelerator y Eclipse 100 se resume en el Cuadro 46. De todos los factores contemplados en el modelo logístico, la concentración de oxitetraciclina, el tiempo de refrigeración y la interacción presentan diferencias significativas ($p < 0,001$). En cuanto al azidiol, presenta un efecto significativo solamente sobre la respuesta del método BRT AiM.

Cuadro 46. Valores de chi-cuadrado (χ^2) y probabilidad (p) de los factores de variación de la respuesta de los métodos microbiológicos para la detección de oxitetraciclina en la leche

Método	Concentración (C)		Refrigeración (R)		Azidiol (A)		R*A	
	χ^2	p	χ^2	p	χ^2	p	χ^2	p
BRT AiM	788,29	0,000	51,05	0,000	21,56	0,000	7,36	0,006
Delvotest MCS ¹	856,70	0,000	45,12	0,000	0,24	0,621	34,80	0,000
Eclipse	973,55	0,000	224,07	0,000	1,67	0,195	10,40	0,001

¹Delvotest MCS Accelerator

En el Cuadro 47 se presentan las ecuaciones de predicción de las frecuencias de resultados positivos obtenidas para cada uno de los métodos junto a los valores de χ^2 y p calculados con el test de bondad de ajuste.

Cuadro 47. Ecuaciones de predicción de la respuesta de los métodos microbiológicos para la detección de oxitetraciclina en la leche

Método	Logist [P]= $\beta_0 + \beta_1 [C] + \sum \beta_2 [R]_i + \beta_3 [A] + \sum \beta_{23} [R]_i * [A]$	Test de bondad del ajuste	
		χ^2	p
BRT AiM	$L = -96,5075 + 0,2854C - 0,2672R - 3,012A - 0,1418R*A$	0,353	0,949
Delvotest MCS ¹	$L = -35,2633 + 0,1505C - 0,04323R - 0,0223R*A$	0,696	0,874
Eclipse 100	$L = -29,6706 + 0,5177C - 0,0251R - 0,0045R*A$	4,096	0,251

¹Delvotest MCS Accelerator; L: $\ln(\text{Probabilidad (+)} / 1 - \text{Probabilidad (+)})$; C: concentración de oxitetraciclina; R: tiempo de refrigeración (0, 24, 48 o 72 horas); A: azidiol (sin conservante=1 y con azidiol=0).

Los bajos valores de los coeficientes β_1 que se observan en las ecuaciones de los distintos métodos al analizar muestras con oxitetraciclina en comparación con los antibióticos betalactámicos, indican la necesidad de incorporar elevadas concentraciones de oxitetraciclina a la leche para poder obtener variaciones en la respuesta de los métodos, debido posiblemente a la baja sensibilidad del *G. stearothermophilus* para la detección de tetraciclinas.

El test de bondad de ajuste presenta valores de probabilidad superiores a 0,001 revelando que no existen diferencias entre las frecuencias determinadas experimentalmente y las estimadas por las ecuaciones logísticas, lo que indica un buen ajuste del modelo de predicción.

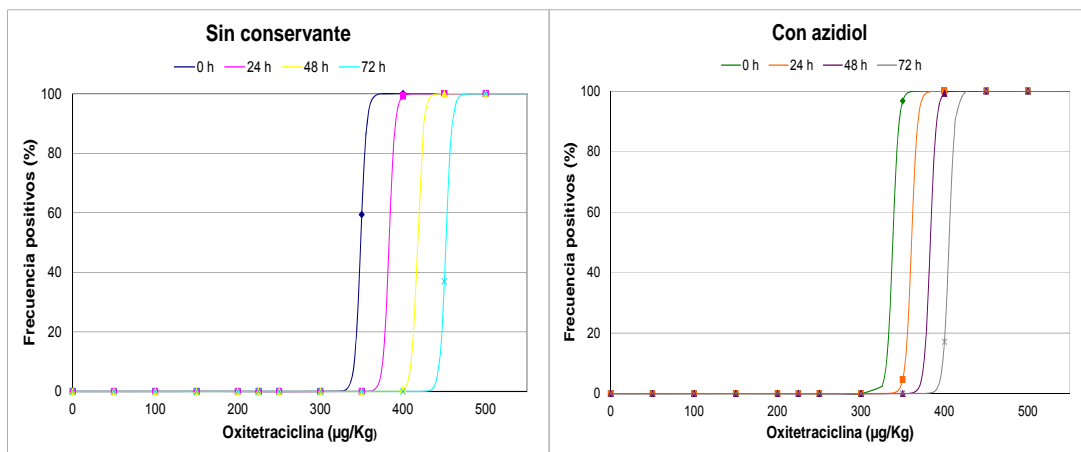
Los cambios ocasionados por el tiempo de refrigeración y la presencia de azidiol como conservante sobre las curvas dosis-respuestas de la oxitetraciclina se presentan en la Figura 47 para los métodos BRT AiM, Delvotest MCS Accelerator y Eclipse 100, tanto para muestras sin conservante como aquellas con azidiol.

En la Figura se aprecia que los resultados positivos son menores a medida que aumenta el tiempo de conservación de las muestras refrigeradas a 4 °C. Además, la frecuencia de resultados positivos es más elevada en las muestras con azidiol en comparación con aquellas que están libres de conservante, lo que provoca que la interacción entre el tiempo de refrigeración y el conservante sea significativa. Para los tres métodos las muestras conservadas con azidiol presentan curvas logísticas muy próximas para los diferentes tiempos de análisis.

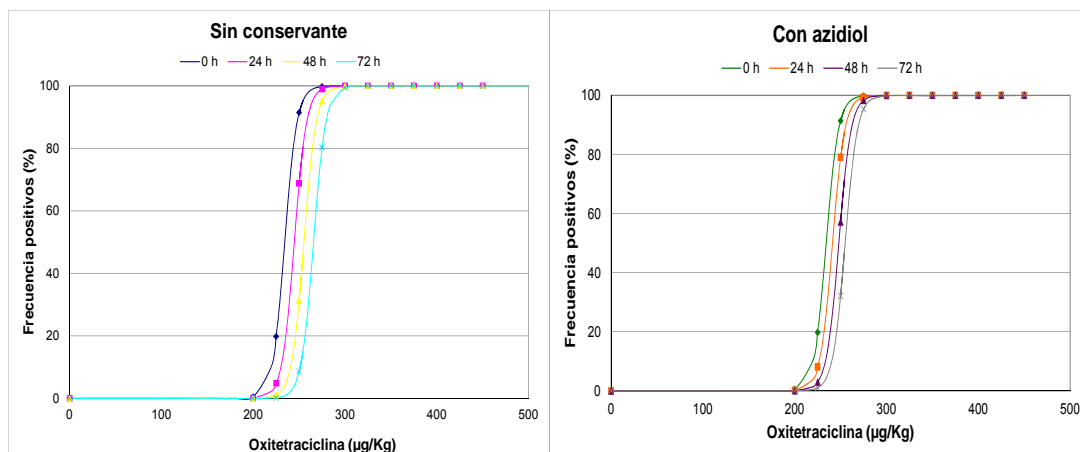
Cuando se realiza el análisis estadístico para evaluar el efecto de las diferentes horas de análisis sobre la curva dosis-respuesta (Cuadro 48), se pone de manifiesto que las muestras analizadas con BRT AiM obtienen resultados significativamente diferentes ($p < 0,05$) a partir de las 48 horas de refrigeración de las muestras de leche. En cambio, para el método Delvotest MCS Accelerator y Eclipse 100 estas diferencias son significativas a partir de las 72 horas.

Para estimar las pérdidas relativas de actividad antimicrobiana, se han calculado los límites de detección de los diferentes métodos para la oxitetraciclina en muestras de leche sin conservante y sin refrigerar. Los límites para los métodos Delvotest MCS Accelerator y BRT AiM son 253 $\mu\text{g/Kg}$ y 359 $\mu\text{g/Kg}$, respectivamente y se encuentran dentro de los rangos (250-500 $\mu\text{g/Kg}$) establecidos por las casas fabricantes (DSM Food y AiM, respectivamente). Sin embargo, para el Eclipse 100 el límite (62 $\mu\text{g/Kg}$) es inferior al indicado por el fabricante (100-150 $\mu\text{g/Kg}$) Zeu-Inmunotec.

BRT AiM



Delvotest MCS



Eclipse 100

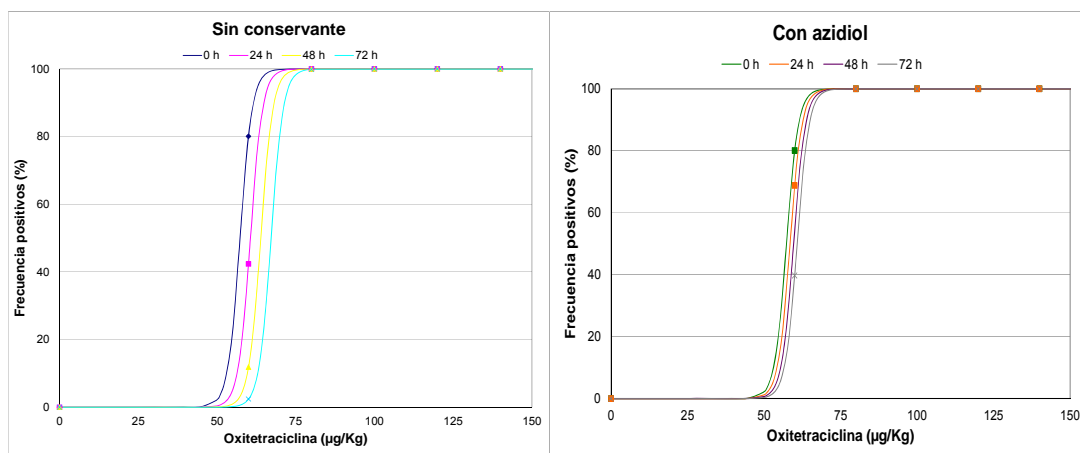


Figura 47. Efecto del conservante y del tiempo de refrigeración de las muestras de leche sobre la curva dosis-respuesta de los métodos microbiológicos para la oxitetraciclina

Cuadro 48. Efecto del tiempo de refrigeración, azidiol y la interacción entre tiempo de refrigeración y azidiol sobre los métodos microbiológicos en el análisis de muestras de leche con oxitetraciclina

Horas de refrigeración	Método	Refrigeración (R)		A		R*A	
		χ^2	p	χ^2	p	χ^2	p
0-24	BRT AiM	0,000	1,000	30,59	0,000	531,78	0,000
	Delvotest MCS ¹	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	1,000
	Eclipse	0,000	1,000	0,000	1,000	6,64	0,009
0-48	BRT AiM	24,72	0,000	41,16	0,000	530,61	0,000
	Delvotest MCS ¹	0,000	1,000	0,000	1,000	8,75	0,003
	Eclipse	0,000	1,000	0,000	1,000	6,64	0,009
0-72	BRT AiM	24,72	0,000	41,11	0,000	525,96	0,000
	Delvotest MCS ¹	30,54	0,000	0,000	1,000	69,85	0,000
	Eclipse	63,91	0,000	0,000	1,000	63,90	0,000

¹Delvotest MCS Accelerator

En el caso concreto de la oxitetraciclina los límites de detección señalados por otros autores con anterioridad resultaron más elevados que los calculados en el presente estudio (Heeschen, 1993; Gist Brocades, 1997; Zaadhof y col., 1997; Zorraquino, 1997).

Por ello, debido a la aplicación del RD 1728/2007 que establece la obligación de implantar controles de detección de antibióticos betalactámicos y tetraciclinas en la leche, los fabricantes han realizado modificaciones en los métodos para mejorar su sensibilidad para la detección de algunos antibióticos, en especial las tetraciclinas o han desarrollado métodos que detectan tetraciclinas a límites más cercanos al LMR como por ejemplo, el BRT Test T que detecta la oxitetraciclina a 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ (LMR), pero teniendo en cuenta que también han bajado los límites para antibióticos betalactámicos.

Además otros autores con el objetivo de mejorar la sensibilidad de los métodos microbiológicos para la detección de tetraciclinas, proponen la incorporación de cloranfenicol en el medio de cultivo de un bioensayo con *G. stearotherophilus* los resultados ponen de manifiesto que al aumentar la concentración de cloranfenicol en el medio disminuyen los límites de detección de las tetraciclinas pero también disminuye la selectividad del método (Nagel y col. 2009).

Por ello, sería recomendable seguir desarrollando los métodos para mejorar los límites de detección de la oxitetraciclina, ya que en los métodos BRT AiM y Delvotest MCS Accelerator son superiores al LMR con el fin de evitar la llegadas a las industrias de leche con residuos de esta sustancia y produzca fallos en la elaboración de productos lácteos (Packham y col., 2001; Berruga y col., 2007 a,b) o incluso puedan llegar a los consumidores.

Después de calcular los LD se han determinado las frecuencias de resultados positivos en muestras sin conservante y con azidol, con el objetivo de poder estimar el efecto del conservante sobre las pérdidas relativas de actividad antimicrobiana. Las frecuencias de resultados positivos se presentan en el Cuadro 49 y las pérdidas de actividad antimicrobiana en la Figura 48.

Cuadro 49. Efecto del tiempo de refrigeración y del azidol sobre los resultados positivos de los métodos microbiológicos en el análisis de muestras de leche con oxitetraciclina

Horas de refrigeración	0	24	48	72
BRT AiM				
Sin conservante	95	0	0	0
Azidol	95	38	0	0
Delvotest MCS Accelerator				
Sin conservante	95	79	44	14
Azidol	95	87	70	45
Eclipse100				
Sin conservante	95	77	38	10
Azidol	95	91	85	75

En el Delvotest MCS Accelerator y Eclipse 100 las PAA calculadas para la oxitetraciclina en muestras sin conservante son aproximadamente del 50% a las 48 horas de conservación y alcanzan el 90% a las 72 horas de almacenamiento. En cambio, las muestras con azidol presentan menores pérdidas incluso a las 72 horas de conservación, que alcanzan tan solo el 20% para el método Eclipse 100. Las pérdidas de oxitetraciclina en el BRT AiM en muestras sin conservante son máximas ya a las 24 horas y con azidol a las 48 horas.

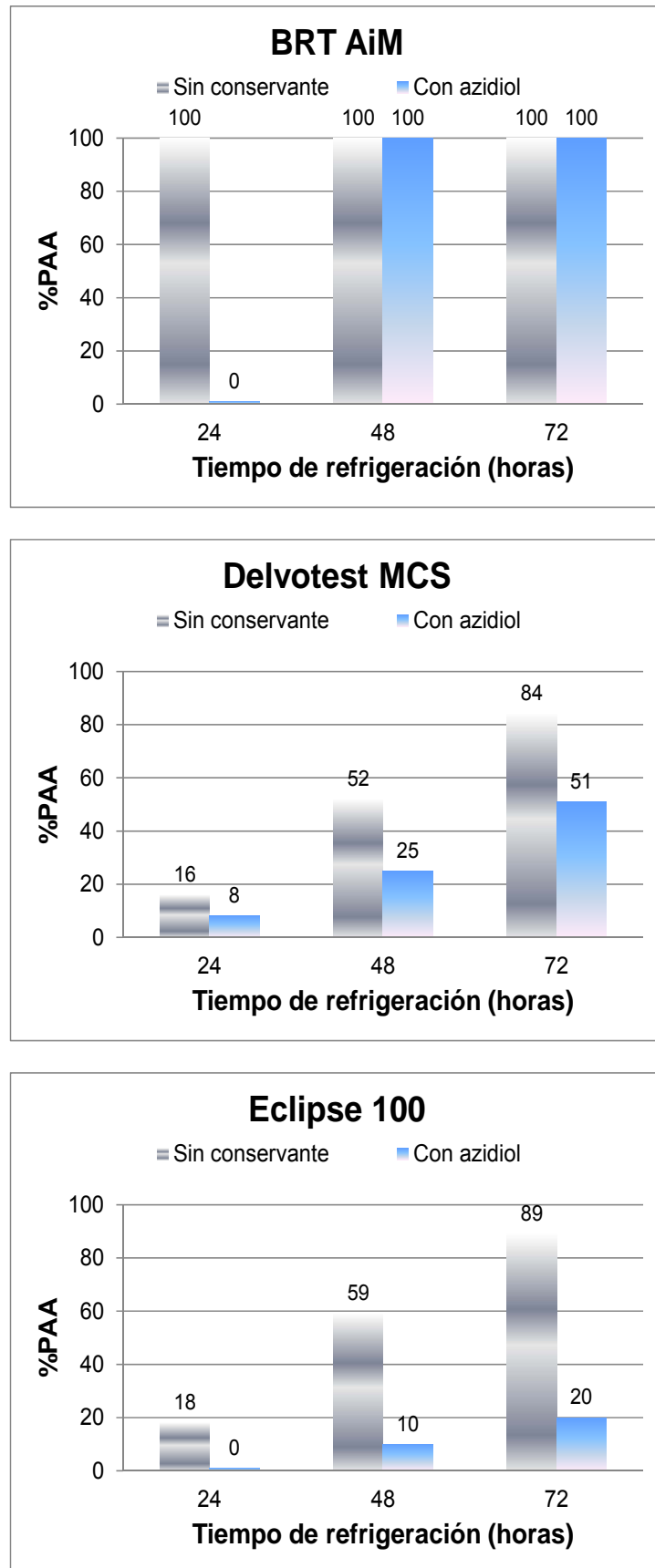


Figura 48. Efecto del tiempo de refrigeración sobre las pérdidas relativas de actividad antimicrobiana (PAA) de oxitetraciclina en la leche

Los estudios que evalúan la influencia del tiempo de refrigeración de muestras de leche con oxitetraciclina determinan la estabilidad de esta molécula mediante técnicas cuantitativas como cromatografía líquida (LC). No se encontraron trabajos sobre el efecto del tiempo de refrigeración en los resultados de los métodos de cribado cualitativos.

Podhorniak y col. (1999) estudiaron la estabilidad de tetraciclinas en la leche a 4 y 25 °C durante 24, 48 y 72 horas para ello fortificaron las muestras de leche con 50 µg/kg de tetraciclinas y las analizaron por HPLC. No observaron pérdidas de las tetraciclinas en las muestras conservadas a 4 °C durante 48 horas o a 25 °C durante 24 horas. Sin embargo, estas pérdidas se encontraron después de 72 horas a 4 °C y 48 horas a 25 °C, respectivamente.

En otro trabajo realizado por Samanidou y col. (2007) sobre la validación de un método de confirmación LC para la determinación de 7 tetraciclinas en leche, estudiaron la estabilidad de los antibióticos en los extractos obtenidos y refrigerados a 4 °C en la oscuridad, concluyeron que bajo estas condiciones, solo fueron estables durante una semana de almacenamiento.

También Roca y col. (2008) observaron un efecto significativo del tiempo de refrigeración a 4 °C sobre la estabilidad de tetraciclinas en la leche, cuando las muestras contenían 100 µg/Kg de oxitetraciclina a las 72 horas de refrigeración calculando una degradación del 10,4%. A su vez Himanish y col. (2008) en un estudio sobre la estabilidad de la oxitetraciclina en leche obtuvieron pérdidas del 6-18% entre las 24 y 96 horas de refrigeración.

De todos los resultados obtenidos en este tercer estudio, se puede establecer, que si las muestras de leche no se analizan por los métodos microbiológicos el mismo día de su llegada al laboratorio y se mantienen en refrigeración se pueden obtener resultados no reproducibles, ya que se produce una pérdida de actividad antimicrobiana (PAA), y en consecuencia los métodos microbiológicos al ser de respuesta cualitativa presentan menores porcentajes de resultados positivos.

En caso de no poder analizar las muestras de leche el mismo día de su llegada al laboratorio sería conveniente refrigerar las muestras de leche con azidiol, dado que con la presencia de conservante en las muestras de leche la frecuencia de resultados positivos en los métodos microbiológicos es más constante, por lo general.

CONCLUSIONES

V. CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los distintos estudios realizados se deducen las conclusiones que se exponen a continuación.

1. PRIMER ESTUDIO: Evaluación de los métodos de detección de residuos de antimicrobianos en la leche de vaca

- Los métodos microbiológicos presentan porcentajes de selectividad muy elevados: BRT AiM (99%), Blue Yellow (100%), CMT Copan (100%), Delvotest MCS Accelerator (98%), Delvotest SP-NT (98%), Eclipse 50 (99%) y Eclipse 100 (99%).
- Los valores de selectividad de los métodos específicos de unión a receptores proteicos son también elevados: Beta Star (97%), Delvo XP (99%), Rosa Charm MRL BL (100%), Rosa Charm TET (99%), Snap BL (100%), Snap TET (100%) y Twinsensor (98%), siendo la selectividad más baja la encontrada en el método enzimático Penzym (82%), debido a un elevado número de resultados dudosos.
- Para los métodos microbiológicos, la sensibilidad a niveles del LMR resulta, en general adecuada para los antibióticos betalactámicos, excepto en el estudio de la cefquinoma y el ceftiofur que la sensibilidad son muy bajas o incluso nula (0%) al LMR. También se debe destacar que algunos métodos detectan sustancias a concentraciones equivalentes a 0,5 LMR.
- Con respecto a los demás antibióticos no betalactámicos ensayados con los métodos microbiológicos, solamente en el caso de la tilosina y neomicina se presentan valores de sensibilidad adecuados al LMR. La oxitetraciclina es detectada a un nivel del LMR solamente por el método Blue Yellow con una sensibilidad del 53,3%. El resto de antibióticos (DH-estreptomicina, gentamicina, kanamicina, lincomicina, enrofloxacina y colistina) no pueden ser detectados al LMR cuando se analizan por los métodos microbiológicos.
- La sensibilidad al LMR de los métodos específicos a betalactámicos son diferentes según los métodos y los antibióticos ensayados. En general, se puede concluir que los métodos específicos a betalactámicos alcanzan porcentajes de sensibilidad más elevados al LMR para la cefalosporinas que para las penicilinas.

- En el caso de los métodos específicos para la detección de antibióticos no betalactámicos la sensibilidad al LMR solo pudo ser calculada para oxitetraciclina (Snap TET, Rosa Charm MRL TET y Twinsensor), gentamicina (Snap Gentamicin) y enrofloxacin (Rosa Enroflox y Equinox), que resultó en todos los casos del 100%. También estos métodos son capaces de detectar estas sustancias a concentraciones por debajo del LMR.

En general de este primer estudio se puede concluir, que casi todos los métodos presentan una selectividad muy elevada lo que indica que son muy adecuados para el análisis de la leche de vaca presentando una frecuencia baja de resultados “falsos positivos”. También que los métodos son muy adecuados para la detección de antibióticos betalactámicos al LMR, por el contrario no resultan tanto para la detección de tetraciclinas, a excepción de los métodos específicos de esta familia, aminoglucósidos, macrólidos y quinolonas.

2. SEGUNDO ESTUDIO: Estrategia analítica para la detección de residuos de antimicrobianos en la leche de vaca

A modo de síntesis se puede establecer que no existe un único método que pueda detectar la totalidad de los antimicrobianos más utilizados en España para el tratamiento de la mastitis y otras patologías de tipo infeccioso, sin embargo, es posible establecer algunas consideraciones generales a fin de lograr una detección más eficaz de los residuos de antibióticos en la leche y así, garantizar su seguridad y la de los productos lácteos derivados.

- Un 21,3% de los antibióticos empleados en España (gentamicina, estreptomina, kanamicina, lincomicina y colistina) no llegan a ser detectados por los métodos de cribado que actualmente se utilizan.
- La aplicación de un único método microbiológico permite detectar aproximadamente entre 51,3 y un 70,4% de los antibióticos más empleados en España. Por otra parte, los métodos específicos de receptores proteicos presentan un porcentaje de cobertura entre un 29,7 y un 54,6% de estos antibióticos.
- La combinación de dos métodos (microbiológico-específico) en forma simultánea permite detectar aproximadamente entre un 65,8 y un 71,5% de los antibióticos, es decir, no mejora notablemente la frecuencia de moléculas a detectar con respecto a los métodos microbiológicos, pero permite un control más eficiente, al efectuar dos análisis por cada muestra de leche.

- Debido a que el Real Decreto 1728/2007 especifica la obligatoriedad de utilizar métodos que al menos detecten residuos de betalactámicos y tetraciclinas en los laboratorios de control la incorporación de métodos específicos para oxitetraciclina (Rosa TET, Snap TET y Twinsensor TET), permitirá aumentar el porcentaje de cobertura de detección de antibióticos entre un 68,1 y 73,8%.
- La implementación de análisis para moléculas como la gentamicina (Snap Gentamicin) y enrofloxacin (Equinox o Rosa Enroflox) aumentaría en perfil de detección en un 81,8% ya que estas sustancias presentan un mayor uso que la oxitetraciclina para el tratamiento de enfermedades del ganado vacuno lechero, por ello, se sugiere su incorporación en los controles periódicos de la leche.
- Por último, deberían incorporarse controles de residuos de estreptomina y kanamicina en la leche dado que ambos antibióticos presentan una frecuencia de uso considerable en España (6,48% y 4,95%, respectivamente), aunque esto resulta difícil desde el punto de vista práctico ya que existen pocos métodos comerciales que detecten estas sustancias y los que se encuentran se basan en técnicas de inmunoensayo (ELISA) o radio-inmunoensayos (Charm II) lo que implica una mayor dificultad analítica, así como un coste más elevado.

El actual sistema de control de la leche cruda de vaca no parece totalmente adecuado en especial en lo que se refiere a la detección de tetraciclinas, ya que los métodos utilizados no presentan una buena sensibilidad para su detección. Además, dentro del control de residuos de antibióticos en la leche no se realizan análisis para la detección de otras sustancias que presentan un mayor uso en el tratamiento de enfermedades del ganado vacuno lechero.

3. TERCER ESTUDIO: Influencia de los factores relacionados con la toma muestras sobre la respuesta de los métodos microbiológicos de detección de residuos de antimicrobianos en la leche de vaca

En cuanto a los resultados de la influencia de la refrigeración y la presencia de azidiol en las muestras de leche se puede concluir:

- El tiempo de refrigeración y la interacción entre el tiempo de refrigeración y azidiol afectan de forma significativa a la frecuencia de resultados positivos de los antibióticos betalactámicos (amoxicilina, ampicilina y penicilina G) y de la oxitetraciclina, ya que en todos los casos el número de resultados positivos

disminuye al aumentar el tiempo de refrigeración, siendo los resultados positivos más elevados al refrigerar las muestras de leche con azidiol.

- Los límites de detección, calculados a partir de las muestras sin refrigerar y sin conservante, para los diferentes métodos, son generalmente inferiores a los límites proporcionados por las casas comerciales y también a los Límites Máximo de Residuos establecidos por la UE para la leche de vaca.
- Las pérdidas de actividad antimicrobiana (PAA) de la amoxicilina, ampicilina, penicilina G y oxitetraciclina aumentan con el tiempo de conservación y son menores en las muestras conservadas con azidiol.

Por todo ello, resultaría conveniente refrigerar las muestras de leche con azidiol y realizar el análisis dentro de las primeras 48 horas de almacenamiento a 4 °C, ya que de este modo las pérdidas son menores y los resultados más reproducibles.

Todos los resultados presentados en este trabajo indican la necesidad de continuar con los estudios sobre los métodos de detección de residuos de antimicrobianos en la leche procediendo a la validación de nuevos métodos comercializados y realizando una labor divulgativa sobre los diferentes agentes implicados en el sistema de control de los residuos de antibióticos en la leche, así como insistiendo a las casas fabricantes para mejorar los límites de detección de determinadas sustancias antimicrobianas de uso generalizado. Todo ello para disponer de un mecanismo eficaz en el control de los residuos de medicamentos y de este modo evitar su llegada a la cadena alimentaria.

BIBLIOGRAFÍA

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Albright V., Tuckey S., Woods G. 1961. Antibiotics in milk: A Review. *J. Dairy Sci.*, 44: 770-807.
- Althaus R. L., 1999. Métodos de detección de inhibidores en leche de oveja de raza Manchega. Tesis doctoral, Universidad Politécnica de Valencia. 309 pp.
- Althaus R., Molina M.P., Rodríguez M., Fernández N. 2001. Evaluation of the BRT method for detection of betalactams antibiotics in ewe milk. *Milchwissenschaft*, 56: 568-572.
- Althaus R., Peris C., Montero A., Torres A., Molina M.P. 2002. Detection limits of antimicrobial agents in ewe milk by Delvotest[®]. *Milchwissenschaft*, 57:660-663.
- Althaus R., Molina M.P., Peris C., Torres A., Fernández N. 2003. Accuracy of BRT and Delvotest microbial inhibition test as affected by composition of ewe's milk. *J. Food Prot.*, 66: 473-478.
- Althaus R., Berruga M., Montero A., Roca M., Molina M.P. 2009. Evaluation of a microbiological multi-residue system on the detection of antibacterial substances in ewe milk. *Anal.Chim. Acta*, 632: 156-162.
- Anderson K., Moats W., Rushing J., O'Carroll J. 1998. Detection of milk antibiotic residues by use of screening test and liquid chromatography after intramammary administration of amoxicillin or penicillin G in cows with clinical mamitis. *Am. J. Vet. Res.*, 59: 1096-1100.
- Andrew S. M., Frobish R. A., Paape M. J., Maturin L. J. 1997. Evaluation of selected antibiotic residue screening test for milk from individual cows and examination of factors the affect the probability of false-positive outcomes. *J. Dairy Sci.*, 80: 3050-3057.
- Angelidis A.S., Farver T.B., Cullor J.S. 1999. Evaluation of the Delvo-X-Press assay for detecting antibiotic residues in milk samples from individual cows. *J. Food Prot.*, 62: 1183-1190.
- Anthony F., Acar J., Franklin A., Gupta R., Nicholls T., Yamura S., Thompson S., Threlfall E.J., Vose D., Van Vuuren M., White D.G. 2001. Antimicrobial resistance: responsible and prudent use of antimicrobial agents in veterinary medicine. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 20: 829-839.
- AOAC. 2000. Official Methods of Analysis of AOAC International. 17th edition. Ed. AOAC International, Arlington, Virginia, USA.
- Barbosa M., 1997. Occurance of antibiotics in ewe and goat milk-application and suitability or various test kits. Simposium Non-destructive testing, pasteurization requeriments and antibiotics in dairy products. International Dairy Federation, Lisboa, Portugal.
- Baynes R., Lyman R., Anderson K., Brownie C. 1999. A preliminary survey of antibiotic residues and viable bacteria in milk from three Caribbean basin countries. *J. Food Prot.*, 62: 177-180.
- Bywater R. J., 2004. Veterinary use of antimicrobials and emergence of resistance in zoonotic and sentinel bacteria in the EU. *J. Vet. Med.*, 51: 361-363.
- Bell C., Rhoades J.R., Neaves P., Scanella D. 1995. An evaluation of the IDEXX SNAP test for the detection of beta-lactam antibiotics in ex-farm raw milks. *Netherlands. Milk and Dairy J.*, 49: 15-25.

Berruga M. I., Molina M. P., Noves B., Roman M., Molina A. 2007a. *In vitro* study about the effect of several penicillins during the fermentation of yogurt made from ewe's milk. *Milchwissenschaft*, 62: 303-305.

Berruga M. I., Battacone G., Molina M. P., Roman M., Molina A. 2007b. Influence of beta-lactams on Manchego cheese manufacture. 148. 5th International Symposium on the challenge to sheep and goats milk sectors. International Dairy Federation, Alghero, Italia.

Berruga M.I., Roca M., Molina M. P., Molina A. 2009. Evaluation of receptor-based tests for detection of penicillins and tetracyclines residues in ewe milk. IDF World Dairy Summit United Dairy World. Berlín.

Bishop J.R., White C. H. 1984. Antibiotic residue detection in milk. A review. *J. Food Prot.*, 47: 647-652.

Brady M. S., Katz S. E. 1987. Simplified plate diffusion system for microbial assays of antibiotics. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 70: 641-646.

Borrás M; Roca M. I.; Beltran M. C, Berruga M. I; Molina M. P. 2009. Influencia de factores relacionados con la toma de muestras en la detección de residuos de antibióticos en la leche. Métodos microbiológicos. I Jornadas de Investigación en Seguridad Alimentaria. Valencia, Spain.

Booth K., Kimura S., Lee H., Ikeda-Saito M., Caughey W. 1986. Bovine myeloperoxidase and lactoperoxidase each contain a high affinity binding site for calcium. *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 160: 897-902.

Botsoglou N. A., Fletouris, J. D. 2001. Drugs residues in foods: Pharmacology, food safety, and analysis. Serie Food Science and Technology. Ed. Marcel Dekker, Inc. New York.

Camacho L.M., Ciprano M., Cruz B., Gutierrez I., Hernandez P.E., Penaloza, I., Nambo O. 2010. Antibiotic residues in raw milk marketed in the región Tierra Caliente of Guerrero, Mexico. *Redvet*, 11: 1-11.

Carlsson A., Björck L. 1989. Lactoferrin and lysozyme in milk during acute mastitis and their inhibitory effect in Delvotest. *J. Dairy Sci.*, 72: 3166-3175.

Carlsson A., 1991. Detection of inhibitory substances in milk. Dissertation. Institutionen för Livsmedelsvetenskap. Swedish University of Agricultural Sciences, 72 pp.

Charm S., Ruth G. 1993. Advances in Charm technology for Antimicrobial residues in milk. 32-46. *In* Inhibitory substances in milk-current analytical practice. IDF Bull. N° 283. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica.

Continanza R.M., Tiburtini S., Paggi U., 2003. Determinazione di inibenti nel latte mediante kit microbiologico. *Latte* 28: 80-84

Contreras A., Paape M. J., Di Carlo A. L., Miller R. H., Rainard P. 1997. Evaluation of selected antibiotic residue screening tests for milk from individual goats. *J. Dairy Sci.*, 80: 1113-1118.

CRL, Guidelines for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines (Initial validation and transfer). 20/1/2010.

http://www.vri.cz/userfiles/file/hide/EUdocuments/Guidelines_2010-01-20.pdf

Cullor J. 1992. Test for identifying antibiotic residues in milk: how well do they work. *Vet. Med.* 87: 1235-1241

Dalton J. 2006. Antibiotic residue prevention in milk and dairy beef. *Western Dairy News*, 6: 71-79.

Debackere M. 1995. Comparison of disk assay, Intest and Delvotest P sensitivity for antibiotic residues in milk. 41-53. *In* Residues of antimicrobial drugs and other inhibitors in milk. IDF S. I. N° 9505. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica.

Decisión 2002/657/CEE del Consejo del 12 de Agosto de 2002 por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados. Diario Oficial n° L 73: 30-31.

Del Prato O. S., 1997. Gli inibenti nel latte e i loro effetti sulle trasformazioni casearie. *Late*, 22: 40-48.

Demoly P., Romano A. 2005. Update on beta-lactam allergy diagnosis. *Curr. Allergy Asthma Rep.*, 1: 9-14.

Directiva 96/23/CEE del Consejo, de 29 de abril de 1996, relativa a las medidas de control aplicables respecto de determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos y por la que se derogan las Directivas 85/358/CEE y 86/469/CEE y las Decisiones 89/187/CEE y 91/664/CEE. Diario Oficial n° L 125: 10-32.

Directiva 2001/82/CEE del Parlamento Europeo y del Consejo de 6 de noviembre de 2001 por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos veterinarios. Diario Oficial n° L 311: 1-66.

Directiva 2004/28/CEE del Parlamento Europeo y del Consejo de 31 de marzo de 2004 que modifica la Directiva 2001/82/CE por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos veterinarios. Diario Oficial n° L 136: 58-84.

Diserens, J. M., Henzelin A., Le Breton M.H., Perroud M.C. 2005. Antibiotics in milk: Actual situation & compilation of comercial available screening methods for the detection of inhibitors/antibiotics residues in milk. Quality & Safety Department, Nestlé Research Center, Lausanne, Switzerland.

Erskine R. J., Wagner S., DeGraves F. J. 2003. Mamitis therapy and pharmacology. *Vet. Clin. Food Anim.*, 19: 109-138.

Fabre J. M., Moretain J. P., Ascher F., Brouillet O., Berthelot X. 1995. Main causes of inhibitors in milk a survey in one thousand french dairy farms. 27-31. *In* Residues of antimicrobial drugs and other inhibitors in milk. International Dairy Federation S. I. N° 9505, Bruselas, Bélgica.

FAVV. 2003. Annual report, Federal Agentschap voor de Veiligheid van de Voedselketen (Federal Agency for Safety of the Food Chain) Belgica. Disponible en <http://www.favv.fgov.be>.

FDA (Food and Drug Administration). 2003. Guidance for industry: Analytical testing of drugs substances and drug products (Revision 2). The United States Food and Drug administration. Rockville, MD, USA

Frank S. 1995. Bestimmung der Nachweisgrenzen ausgewählter Antibiotika und Sulfonamide im Brillantschwarz-Reduktionstest. Diss. Universität Diplomarbeit Their. Triesdorf, Germany. 70 pp.

Foissy H., Lindner G., Fugger F., Wagner M. 2005. Investigations on the reproducibility of microbial inhibitor test results in raw milk after sample storage. *Wiener-Tierärztliche-Monatsschrift*, 92: 126-130

Fonseca G.P., Cruz A., Faria J., Silva R., Moura M., Carvalho L. 2009. Antibiotic residues in Brazilian UHT milk: a screening study. *Cienc. Tecnol. Aliment.*, 29: 451-453.

- Fontes E., Martins S., Carrapiço B. 1996. Determination of penicillin in milk by high pressure liquid chromatography. *Toxicology Letters*, 35TH European Congress of Toxicology, 88: 85.
- Gandiano L., Chiappetta G. 1998. Confronto tra metodi rapidi per la determinazione di antibiotici beta-lactamici nel latte. *Il Latte*, 23: 71-74
- Gist-Brocades. Delvotest. 1997. Informe Técnico. 9 pp.
- Ghidini S., Zanardii E., Varisco G., Chizzolini R. 2003. Residues of beta lactam antibiotics in bovine milk: confirmatory analysis by liquid chromatography tandem mass spectrometry after microbial assay screening. *Food Addit. Contam.*, 20: 528-534.
- Giguère S., Prescott J.F., Baggot J.D., Walker R.D., Dowling P.M. 2006. Antimicrobial drug action and interaction: An introduction. *In* Antimicrobial therapy in veterinary medicine. 4th ed. Ed. Blackwell Publishing. p. 3-10.
- Grundwald L., Petz M. 2003. Food processing effects on residues: penicillins in milk and yogurt. *Anal. Chim. Acta*, 483: 73-79.
- Gruet P., Maincent P., Berthelot X., Kaltsatos V. 2001. Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspectives. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 50: 245-259.
- Guay R., Cardinal P., Bourassa C., Brassard N. 1987. Decrease of penicillin G residue incidence in milk: a fact or an artefact?. *Int. J. Food Micro.*, 4: 187-196.
- Haagsma N. 1993. Stability of veterinary drug residues during storage, preparation and processing.41-49. *In* Proceedings of Euro Residue II Conference on residues of veterinary drugs in food. Ed. Haagsma, N., Ruiter, A., Czedik-Eysenberg, P. B., Veldhoven, Holanda.
- Heeschen W. H. 1993. Residues of antibiotics and sulfonamides in milk.3-12. Inhibitory substances in milk-current analytical practice. *IDF Bull N° 283*. International Dairy Federation, Bruselas, Bélgica.
- Heeschen W. H., Blüthgen A. 1995. Veterinary drugs and pharmacologically active compounds.16-39. *In* Residues and contaminants in milk products. *IDF S. I. N° 9101*.International Dairy Federation. Bruselas, Belgica.
- Himanish D., Mahadeva N., Jayaraman S., Bawa A. S. 2008. Effect of processing, preservation and storage on oxytetracycline in spiked milk. *J. Food Sci. Technol.*, 45: 50-55.
- Honkanen-Buzalski T., Reybroeck W. 1997. Residues and contaminants in milk and milk products. International Dairy Federation. Special Issue 9701. *IDF*: 26-33-
- Hozová B., Katmüllerová M. 2001. Assay of antibiotic detection limits in cow's milk model samples and comparison of sensitivity of various detection systems (Disc difusión meted, Delvotest SP and Penzym S 100). *Czech. J. Food Sci.*, 19: 125-131.
- IDF (International Dairy Federation). 1991. Detection and confirmation of inhibitors in milk and milk products. International IDF Standard N° 258. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica.
- IDF (International Dairy Federation). 1995. Milk and milk products. Guidance on sampling. International IDF Standard N° 50C. Bruselas, Bélgica.
- IDF (International Dairy Federation). 1997. Guidance for the standardized description of microbial inhibitor test. *IDF Group E-503. Antibiotics, Appendix 3*: 1-16. Bruselas, Bélgica

- IFAH (International Federation for Animal Health).2006. Annual Report. IFAH. Bruselas, Belgica
- Jaskch P. 1988. Der penzym test eine enzymatische schnellmethode zum nachweis von beta-lactam-antibiotika in Rohmilch. Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, Universität München, 29: 898-903.
- Petrović M., Katić R., Bugarski D. 2008. Comparative examination of the analysis of β -Lactam antibiotic residues in milk by enzyme, receptor–enzyme and inhibition procedures. Food Anal. Methods, 1:119–125.
- Jones G., Seymour E. 1988. Cowside antobiotic residue testing. J. Dairy Sci., 71: 1691-1699.
- Kang J. H., Kondo F. 2001. Occurrence of false-positive results of inhibitor on milk samples using the Delvotest SP assay. J. Food Prot., 64: 1211-1215.
- Kantiani L., Farré M., Barcelo D. 2009. Analytical methodologies for the detection of β -lactam antibiotics in milk and feed samples. Trends Anal. Chem. 28: 729-744.
- Katz S. E., Siewierski M. 1995. *Bacillus Stearothermophilus* disc assay: A review. J.AOAC Int., 78: 1408-1415.
- Kress, C., Seidler, C., Kerp, B., Schneider, E., Usleber, E. 2007. Experiences with an identification and quantification program for inhibitor-positive milk samples. Anal. Chim. Acta, 586: 257-279.
- Lacroix D. 1995. Le dépistage des antibiotiques à la ferme le producteur de lait québécois. Le Producteur de lait Québécois, 30-31.
- Le Breton M.H., Savoy-Perroud M.C., Diserens J.M., 2007. Validation and comparison of the Copan Milk Test and Delvotest SP-NT for the detection of antimicrobials in milk. Anal. Chim. Acta, 586: 280-283.
- Linage B., Gonzalo C., 2006. Eficacia de una combinación antibiótica a base de penetamato, penicilina y framecitina usada como terapia de secado en ovino lechero. 104-107. XXII Jornadas del Grupo de Técnicos especialistas en Mamitis y Calidad de la Leche (G-Temcal), Barcelona, España.
- Linage B., Gonzalo C., Carriedo J., Asensio J., Blanco M., De la Fuente L., San Primitivo F. 2007. Performance of Blue-Yellow screening test for antimicrobial detection in ovine Milk. J. Dairy Sci., 90: 5374-5379.
- Luitz M., Suhren G., Heeschen W. 1995. Interactions of antimicrobials in milk - consequences for the detection with Delvotest SP special.214-215. *In* Residues of antimicrobial drugs and other inhibitors in milk. IDF S. I. N° 9505.International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica.
- Luitz M., Suhren G., 1995a. Advantages of photometric evaluation of microbial inhibitor test. 177-181. *In* Residues of antimicrobial drugs and other inhibitors in milk. IDF S. I. N° 9505.International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica.
- Luitz M., Suhren G. 1995b. Evaluation of microbial inhibitor test with indicator in microtitre plates by photometric measurements. Milchwissenschaft, 50: 465-470.
- Luitz M., Suhren G. 1996. Nachweis von tetracycline in milch mit verschiedenenen modifikationen des brilliant-schwarzreduktionstes und dem Delvotest SP. DMZ, Lebensmittel industrie und Milchwirtschaft, 117: 1010-1015.
- Luitz M., Suhren G., Heeschen W. 1996. Interactions of antimicrobials in milk-consequences for the detection by a microbial inhibitor test. Milchwissenschaft, 51: 390-392.

Maron-Carraro C.N., Rodrigues da Veiga D., 2000. Evaluation of three methods of detecting antibiotic residue in milk. *Revista do Instituto de Laticínios Candido Tostes*, 54: 77-80.

Mäyrä-Mäkinen A. 1993. The Valio T 101.29-31. *In* Inhibitory substances in milk - current analytical practice. IDF Standard Bull. N° 283. International Dairy Federation, Bruselas, Bélgica.

Mc Grane P., Rowe M.T., Anger S. 1996. Evaluation of Delvotest SP and Charm AIM-96 for the detection a range of antibiotics in milk. *Milchwissenschaft*, 51: 330-332.

Merck & CO. 2006. The Merck Index.14th Ed. Merck Research Laboratories. Merck & CO., INC. Whitehouse Station, NJ, USA.

M-I-96-10 REVISION #3. Tables listing equivalent beta-lactam tests.<http://www.cdffa.ca.gov/ahfss/mdfc/pdfs/mi-96-10.pdf>.

MAPYA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación). 2006/2007. <http://www.mapya.es/>.

Miranda J.M., Mondragon A., Vazquez B.I., Fente C.A., Cepeda A., Franco C. M. 2009. Influence of farming methods on microbiological contamination and prevalence of resistance to antimicrobial drugs in isolates from beef. *Meat Sci.* 82: 284-288.

Mitchell J. M., Griffiths M. W., MC Ewen S. A., MC Nab W. B., Yee A. J. 1998. Antimicrobial drug residues in milk and meat: causes, concerns, prevalence, regulations, test, and test performance. *J. Food. Prot.*, 61: 742-756.

Moats W. A, Anderson K. L., Rushing J. E. Buckley S. 2000. Conversion of cephapirin to deacetylcephapirin in milk and tissues of treated animals. *J. Agri. Food Chem.*, 48: 498-502.

Molina M.P., Segura C., Lujan A., Diaz A., Althaus R.L., Peris C. 1999. Influencia del calentamiento y tiempo de incubación sobre la respuesta del método BRT[®] en la leche de cabra. *ILE*, 241: 37-41.

Molina M.P., Althaus R.L., Zorraquino M.A., Molina A., Fernandez N., 2002. Evaluation of Penzym enzymatic test in ewe's milk. *Milchwissenschaft*, 57: 33-35.

Molina M.P., Althaus R.L., Balasch S., Torres A., Peris C., Fernandez N., 2003a. Evaluation of screening test for detection of antimicrobial residues in ewe milk. *J. Dairy Sci.*, 86: 1947-1952.

Molina M.P., Althaus R.L., Molina A., Fernandez N. 2003b. Antimicrobial agents detection in ewes milk by the microbial inhibitor test brilliant test-BRT AiM[®]. *Int. Dairy J.*, 13: 821-826.

Montero A., Althaus R.L., Molina. A., Berruga I., Molina M.P. 2005. Detection of antimicrobial agents by specific microbiological method Eclipse. *Small Rum. Res.*, 57: 229-237.

Molina M. P., Berruga I., Molina A. 2009. La calidad de la leche de oveja. 355-367. *In*: Ovinotecnia. Producción y economía en la especie ovina. Ed. Prensas Universitarias de Zaragoza. Zaragoza, España.

Moretain J. P. 1996. Elimination des médicaments vétérinaires dans le lait. XIII Reunión de Técnicos especialistas en control de mamitis y calidad de leche. G-Temcal. Pamplona, España.

Morétain J. P., Froger C. 1998. Etude collaborative sur les tests Penzym 100 et Penzym 50. *Revue del ENIL*, 190 : 26-29.

Mourot D., Loussouarn S. 1981. Sensibilité des ferments lactiques aux antibiotiques utilisés en médecine vétérinaire. *Rec. Med. Vét.*,157: 175-177.

- Müller F., Jones. 1993. BR-Test and BRT-AS methods. 24-28. *In* Inhibitory substances in milk-current analytical practice. IDF Bull. N° 283. International Dairy Federation. Bruselas, Belgica.
- Nagel O.G., Molina M.P., Zapata M.L., Althaus R.L. 2009. Robust experimental design for optimizing the microbia inhibitor test for penicillin detection in milk. *Letters in Applied Microbiology*, 48: 744-749.
- Nagel O.G, Zapata M.L., Básilico J.C., Bertero J., Molina M.P., Althaus R.L. 2009. Effect of chloramphenicol on a bioassay response for the detection of tetracycline residue in milk. *J. Food Drug Anal.*, 17: 744-749.
- Nagel O.G, Molina M.P., Althaus R.L. 2010. Optimization of bioassay for tetracycline detection in milk by means of chemometric techniques. *Letters in Applied Microbiology*, 52: 245-252.
- Navratilová O., Borkovcová I., Dracková M., Janstová B., Vorlová L. 2009. Occurrence of tetracycline, chlortetracyclin and oxytetracycline residues in raw cow's milk. *Czech J. Food Sci.*, 5:379-385.
- Oda T., Hiwaki H. 1996. Heat stability of 24 antibiotics in food extracts. *J. Food. Hyg. Soc. Japan*, 37: 97-103.
- Oliver S. P., DUBY R. T., Prange R. W., Tritschler J. P. 1984. Residues in colostrum following antibiotic dry cow therapy. *J. Dairy Sci.*, 67:3081
- Packham W., Broome M. C., Limsowtin G. K. Y., Roginski H. 2001. Limitations of standard antibiotic screening assays when applied to milk for cheesemaking. *Australian J. Dairy Tech.*, 56: 15-18.
- Pikematt M. 2009. Microbial screening methods for detection of antibiotic residues in slaughter animals. *Anal. Bioanal. Chem.*, 4: 1-14.
- Petrovic J. M., Katic V.R., Bugarski D.D. 2008. Comparative examination of the analysis of beta-lactam antibiotic residues in milk by enzyme, receptor-enzyme, and inhibition procedures. *Food Anal. Methods.*, 1: 119-125.
- Philips I. Casewell M., Cox, T., De Groot B., Friis C., Jones R., Nightingale C., Preston R., Waddell J. 2004. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk human health? A critical review of published data. *JAC.*, 53: 28-52.
- Podhorniak L. V., Leake S., Schenck F. J. 1999. Stability of tetracycline antibiotics in raw milk under laboratory storage conditions. *J. Food Prot.*, 62: 547-548.
- Rang H. P., Dale M. M., Ritter J. M. 2000. Quimioterapia de enfermedades infecciosas y malignas. 742-748, *In* Farmacología, 4ª ed. Ed Harcourt. Madrid.
- Real Decreto 217/2004, de 6 de febrero de 2004 por el que se regulan la identificación y registro de los agentes, establecimientos y contenedores que intervienen en el sector lácteo, y el registro de los movimientos de la leche cruda de vaca. BOE, 19 de febrero de 2004, 43: 7802-7806.
- Real Decreto 1728/2007 de 21 de diciembre, por el que se establece la normativa básica de control que deben cumplir los operadores del sector lácteo y se modifica el Real Decreto 217/2004, de 6 de febrero, por el que se regulan la identificación y registro de los agentes, establecimientos y contenedores que intervienen en el sector lácteo, y el registro de los movimientos de la leche. BOE, 17 de enero de 2008, nº 15: 3508-3519.
- Reglamento 2377/90/CEE del Consejo, de 26 de junio de 1990, por el que se establece un procedimiento comunitario de fijación de los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal. Diario Oficial nº L 224: 1-8.

Reglamento 178/2002/CEE 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. Diario Oficial n° L 31: 1-24.

Reglamento (CE) n° 1774/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo de 3 de octubre de 2002 por el que se establecen las normas sanitarias aplicables a los subproductos animales no destinados al consumo humano. Diario Oficial n° L 273: 1-95.

Reglamento 852/2004/CEE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, relativo a la higiene de los productos alimenticios. Diario Oficial n° L 139: 1-54.

Reglamento 853/2004/CEE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal. Diario Oficial n° L 139: 55-205.

Reglamento 854/2004/CEE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, por el que se establecen normas específicas para la organización de controles oficiales de los productos de origen animal destinados al consumo humano. Diario Oficial n° L 139: 206-319.

Reglamento 882/2004/CEE 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. Diario Oficial n° L 165: 1-141.

Reglamento 470/2009/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 6 de mayo de 2009, por el que se establecen procedimientos para la fijación de los límites de residuos de las sustancias farmacológicamente activas en los alimentos de origen animal, se deroga el Reglamento (CEE) n° 2377/90 del consejo y se modifican las Directiva 2001/82/CE del Parlamento Europeo y del Consejo y el Reglamento (CE) n° 726/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo. Diario Oficial n° L 152: 11-22.

Reglamento 37/2010/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de diciembre de 2009, relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere a los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal. Diario Oficial n° L 15: 1-72.

Reybroek W. 1995a. Field test of screening test for the detection of antimicrobial residues in milk. 218-221. *In* Residues of antimicrobial drugs and other inhibitors in milk. IDF S. I. N° 9505. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica

Reybroek W. 1995b. Sensitivity and selectivity of screening tests for the detection of antimicrobial residues in milk. 216-217. *In* Residues of antimicrobial drugs and other inhibitors in milk. IDF S. I. N° 9505. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica.

Reybroeck S., Ooghe S., De Brabander H.F., Daeseleire E. 2010. Validation of the Beta-s.t.a.r 1+1 for rapid screening of residue of β -lactam antibiotics in milk. *Food Addit. Contam.* 27: 1084:1095.

Riediker S., Stadler R.H. 2001. Simultaneous determination of five beta-lactam antibiotics in bovine milk using liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal. Chem. Acta*, 73: 1614-1621.

Riediker S., Rytz A., Stadler, R.H. 2004. Cold-temperature stability of five β -lactam antibiotics in bovine milk and milk extracts prepared for liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry analysis. *J. Chrom. A.*, 1054: 359-363.

Roca M., Berruga A.I., Molina A., Althaus R.L., Molina M.P. 2007. Influencia de factores metodológicos sobre los métodos microbiológicos de detección en leche de

oveja. 89-92. XXXII Jornadas Científicas y XI Jornadas Internacionales de Ovinotecnia y Caprinotecnia, Mallorca, España-

Roca M., Molina M.P., Villegas L., Gabirondo E., Althaus R.L. 2008. Effect of cold storage on stability of tetracyclines in milk. Sesión 1 p. 42. International Dairy Federation. World Dairy Summit 2008, Mexico, DF.

Roca M., Molina M.P., Villegas L., Gabirondo E., Althaus R.L. 2009. Effect of cold storage on stability of penicillins in milk. Sesión 7 p. 15. International Dairy Federation. World Dairy Summit 2009. Berlín. Alemania.

Roca M., Castillo M., Marti P., Althaus R.L., Molina M.P. 2010. Effect of heating on the stability of quinolones in milk. *J. Agr. Food Chem.*, 58: 5427-5431.

Rueg P., Tabone T. 2000. The relationship between antibiotic residue violations and somatic cell counts in Wisconsin dairy herds. *J. Dairy Sci.* 83: 2805-2809.

Šalomskiene J., Jonkuvienė D., Paserpskiene M. 2009. Delvo-X-PRESS ir kitu metodu inhibitoriams zaliame piene nustatyti palyginamasis ivertinimas. *Veterinarija ir Zootechnika*, 45: 73-80.

Samanidou V. F., Nikolaidou K.I., Papadoyamis I. N. 2007. Development and validation of an HPLC confirmatory method for the determination of tetracycline antibiotics residues in bovine muscle according to the European Union Regulation 2002/657/CEE. *J. Sep. Sci.*, 30: 2430-2439.

Sánchez A., Hernández M., Luna J., Moyano G. M., Villanueva M. J., Muñoz E. 2001. Riesgos de residuos en leche debidos a tratamientos indebidos. XVIII Reunión de especialistas en control de mastitis y calidad de leche (G-Temcal). Lisboa.

Sarmah A. K., Meyer M. T., Boxall A. B. A. 2006. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere*, 65: 725-759.

Saville W., Wittum T., Smith K. 2000. Association between measures of milk quality and risk of violative antimicrobial residues in grade-A raw milk. *JAVMA*. 217: 541-545

Sawant A. A., Sordillo L. M., Jayarao B. M. 2005. A survey on antibiotic usage in dairy herds in Pennsylvania. *J. Dairy Sci.*, 88: 2991-2999.

Scannella D., Neaves, P., Keedy K., Bell C. 1997. An evaluation of the Delvo -X- Press β L test for detecting β -lactams in ex-farm raw milks. *Int. Dairy J.* 7: 93-96.

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

Schlegelová J., Ryšánek D. 2000. Effects of heat-processing of milk on validation characteristics of the Charm AIM-96 and Delvotest SP screening tests. *Veterinární Medicína*, 45: 201-207

Schliephake A. 1995. Optische Dichtemessung des Wachstums Ausgewählter Bakterienstämme unter Hemmstoffeinfluß. Tesis Doctoral. Leibniz Universität Hannover, Alemania. 181 pp.

Schneider J., Mastovska K., Lehotay J., Lightfield R., Kinsella B. Shultz E. 2009. Comparison of screening methods for antibiotics in beef kidney juice and serum. *Anal. Chim. Acta.*, 637: 290-297.

Senyk G., Davisodson J., Brown J., Hallstead E., Sherbon J. 1990. Comparasion of rapid test used to detect antibiotic in milk. *J. Food Prot.*, 53: 158-164.

Seymour E., Jones G., Gilliard M. 1988. Comparisons of on-farm screening test for detection or antibiotics residues. *J. Dairy Sci.*, 71: 539-544.

- Schenck F. J., Friedman S. L. 2000. The effect of storage at 4 °C on the stability of ampicillin residues in raw Milk. *Food Add. Contam.*, 17: 675-677.
- Shitandi A., Kihumbu G. 2004. Development and evaluation of a risk assessment tool for control of antimicrobial drug residues in milk. *J. Food. Prot.*, 24: 195-210.
- Sierra D., Sánchez A., Contreras A., Luengo C., Corrales J.C., Morales C.T., De la Fe C., Guirao I., Gonzalo C. 2009a. Detection limits of four antimicrobial residue screening tests for β -lactams in goat's milk. *J. Dairy Sci.*, 92:3585-3591.
- Sierra D., Contreras A., Sánchez A., Luengo C., Corrales J.C., Morales C.T., De la Fe C., Guirao I., Gonzalo C. 2009b. Detection limits of non- β -lactam antibiotics in goat's milk by microbiological residues screening tests. *J. Dairy Sci.*, 92: 4200-4206.
- Sischo, W.; Burns, C. 1993. Field trial of four cow-side antibiotic residue screening test. *JAVMA*, 202: 1249-1254.
- Sischo, W.N. 1996. The issue of testing quality. Symposium drug residue avoidance. *J. Dairy Sci.*, 79: 1065-1073.
- Spisso B. F., Jesús De Oliveira A. L., Gonçalves De Araujo M. A., Monteiro M. A. 2007. Validation of a high-performance liquid chromatographic method with fluorescence detection for the simultaneous determination of tetracycline residues in bovine milk. *Anal. Chim. Acta*, 581: 108-117.
- Statgraphics®. Statistical Graphics Corp. Versión 5.1.1994-2000.
- Suhren G., Heeschen W. 1994. Proficiency study of microbial inhibitor test. *Milchwissenschaft*, 49: 629-633.
- Suhren G. 1995. Possibilities and limitations of microbiological inhibitor test. 159-171. *In Residues of antimicrobial drugs and other inhibitors in milk. IDF S.I. N° 9505. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica.*
- Suhren G., Reichmuth J., Walte H. 1996. Detection of β -lactam antibiotics in milk by the penzym-test. *Milchwissenschaft*, 51: 269-273.
- Suhren G., Beukers R., Reichmuth J. 1997. Guidance for the standardized description of microbial inhibitor test. *Reporte IDF 16 pp. International Dairy Federation, Bruselas, Bélgica.*
- Suhren G., Reichmuth J., 1998. Nachweis von β -laktamantibiotik rückständen in milk-Erfahrungen mit dem Snap-Beta-Laktamtest. *D.M.Z. Lebensmittel industrie und Milchwissenschaft*, 119: 674-681.
- Suhren G. 2002. Antibiotics in milk. *DMZ Lebensmittel industrie and Milchwissenschaft*, 123: 224-231.
- Suhren G., Walte H. 2003. Experiences with the application of method combinations for the detection of residues of antimicrobial drugs in milk from collecting tankers. *Milchwissenschaft*, 58: 536-540.
- Suhren, G. Knappstein, K. 2004. Detection of residues of antibiotics in milk of treated cows by screening methods. *Milchwissenschaft*, 59: 656-660.
- Sumano H. S., Ocampo L. 1997. Quimioterapia de las enfermedades microbianas. 118-137. *In Farmacología Veterinaria*, 2ª ed. Ed. McGraw-Hill Interamericana. Madrid.
- Tollefson L., Karp B. E. 2004. Human health impact from antimicrobial use in food animals. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 34: 514-521.
- Trullols E., Ruisanchez I., Rius F.X. 2004. Validation of qualitative analytical methods. *Trend Anal. Chem.* 23: 137-145.

- UNE-EN ISO 2003a. Guía para la descripción normalizada de ensayos de microbios inhibidores. ISO 13969:2003: Asociación Española de Normalización y Certificación. Madrid, España.
- UNE-EN ISO 2003b. Directrices para la descripción normalizada de inmunoanálisis o análisis de receptores para la detección de residuos antimicrobianos. ISO 18330:2003. Asociación Española de Normalización y Certificación. Madrid, España.
- Van OS J. L., Beukers. 1980. A multitest system for detection of antibiotics in milk. *J. Food Prot.*, 43: 510-511.
- Van Schaik G., Lotem M., Schukken Y. 2002. Trends in somatic cell counts, bacterial counts, and antibiotic residue violations in New York state during 1999-2000. *J. Dairy Sci.*, 85: 782-789.
- Yamaki M., Berruga M.I., Althaus R.L., Molina M.P., Molina A., 2006. Screening of antibiotic residues in ewes' milk destined to cheese by a commercial microbiological inhibition assay. *Food Addit. Cont.*, 23: 660-667.
- Veterindustria. 2010. Marco de buenas prácticas para el uso de antimicrobianos en animales productores de alimentos en la UE. Plataforma Europea para el uso responsable de medicamentos en animales (EPRUMA). <http://www.veterindustria.com>.
- Wiese B., Martin K. 1989. Determination of benzylpenicillin in milk at the pg ml^{-1} level by reversed-phase liquid chromatography in combination with digital subtraction chromatography technique. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 7: 95-106.
- Zaadhof H.J., Maltbauer A., Vormeiter A., Schweizer L., 1997. Zureignung kommerzieller mikrobiologischer hemmstofftests als suchverfahren auf das vorhandensein von antiinfektiva in milch und erzeugnissen auf milchbasis. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 48: 132-144.
- Zaadhof K. J., Schulze S., Maertlbauer E. 2004. Applicability of various microbial inhibitor tests as screening tests for the presence of antimicrobials in goat and ewe milk. *Milchwissenschaft*, 59:179-183.
- Zeng S., Escobar E., Brown-Crowder Y. 1996. Evaluation of screening test for detection of antibiotics residues in goat milk. *Small Ruminat. Res.*, 21: 155-160.
- Zeu-Inmunotec. 2008. Eclipse 100. Informe técnico. Ed. Zeu-Inmunotec S.L. Zaragoza, España.
- Zorraquino M. 1996. Aplicación de un sistema de análisis de riesgos y puntos críticos para asegurar una leche libre de residuos de medicamentos veterinarios. XIII Jornadas del Grupo de Técnicos especialistas en Mamitis y Calidad de la Leche (G-Temcal), Pamplona, España.
- Zorraquino M. 1997. Niveles de residuos de medicamentos veterinarios en leche por debajo de los límites máximos de residuos de la UE. XIV Reunión de técnicos especialistas en control de mamitis y calidad de la leche (G-Temcal), Palma de Mallorca, España.
- Zorraquino M., 1998. Límites de detección del método BRT en leche de vaca. Conferencia XV Jornadas del Grupo de Técnicos especialistas en Mamitis y Calidad de la Leche (G-Temcal), Lugo, España.
- Zorraquino M. A. 2005. Inactivación térmica de sustancias antimicrobianas en leche. Tesis Doctoral. Universidad Pública de Navarra, 140 pp
- Zorraquino M. A., Berruga M. I., Molina M. P. 2007. Investigación de campo de los antibióticos (principio activo-formulación) utilizados en vacuno de leche en España y patología tratada. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid, España. 79 pp.

Zorraquino M. 2008. Investigación de campo sobre tratamientos antimicrobianos en vacuno de leche en procesos patológicos no mamíticos. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid, España. 115 pp.

Zorraquino M. A., Roca M., Castillo M., Althaus R. L., Molina M. P. 2008a. Effect of thermal treatments on the activity of quinolones in milk. *Milchwissenschaft.*, 63:192-195.

Zorraquino M. A., Roca M., Fernandez N., Molina M. P., Althaus R. L. 2008b. Heat inactivation of beta-lactam antibiotics in milk. *J. Food Prot.*,71: 1193-1198.

Zvirauskiene R., Salomskiene J., 2007. An evaluation of different microbial and rapid tests for determining inhibitors in milk. *Food control*, 18: 541-547.

Zwald A. G., Ruegg P. L., Kaneene J. B., Warnick L. D., Wells S. J., Fossler C., Halbert L. B. 2004. Management practices and reported antimicrobial usage on conventional and organic dairy farms. *J. Dairy Sci.*, 87: 191-201.