

***Instituto de Ciencia y Tecnología Animal
Universidad Politécnica de Valencia***



**EFFECTO DE LA REFRIGERACIÓN DE LA LECHE
SOBRE LOS MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS DE
DETECCIÓN DE ANTIBIÓTICOS**

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Alumna:

Milagro Borràs Llopis

Director Académico

M^a Pilar Molina Pons

Rafael Lisandro Althaus

Valencia, Diciembre de 2009

Trabajo financiado por el Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino
(Programa de Estudios del Departamento número 31.08) y la Generalitat
Valenciana (A-09/08)

AGRADECIMIENTOS

A mi directora, Pilar Molina Pons por su implicación y confianza depositada durante estos años.

A mi codirector Rafael Lisandro Althaus por estar presente a pesar de tanta distancia.

A los fabricantes de métodos BRT[®] AiM (Analytik in Milch Produktions-und Vertrieb, Munich, Alemania), Delvotest[®] Accelerator (DSM Food Specialties, Delf, Holanda) y Eclipse[®] 100 (ZEU-Inmunotec S.A., Zaragoza) por la cesión temporal de equipos y el apoyo técnico recibido.

M^a Carmen Beltrán, por su infatigable compañía y por transmitirme tanta ilusión.

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

A mi familia, por creer en mí incluso en los momentos difíciles.

RESUMEN

Actualmente resulta necesario establecer sistemas de control para asegurar que la leche esta libre de residuos de medicamentos, o que estos se encuentran por debajo de los límites permitidos, y de este modo cumplir la legislación sobre higiene de los alimentos, así como cubrir determinados aspectos de la trazabilidad de la leche.

El control de la presencia de residuos de medicamentos 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.

En España para garantizar la trazabilidad de la leche se publicó el Real Decreto 217/2004 donde se identifican y registran todos los agentes del sector lácteo mediante la herramienta informática base de datos "Letra Q". Recientemente con el Real Decreto 1728/2007 se incorpora al "Letra Q" el Módulo de calidad de la leche para cumplir con los Reglamentos Europeos contenidos en el "paquete de higiene de los alimentos" (Reglamentos 852, 853 y 854/2004/CEE).

El Real Decreto 1728/2007 establece la normativa básica de control que deben cumplir todos los operadores del sector lácteo, en la toma de muestras y su conservación, así como los controles analíticos que hay que realizar en las explotaciones y centros lácteos, además de aspectos referentes a los laboratorios de análisis.

Ante los escasos estudios sobre la influencia de los factores metodológicos relacionados con la toma de muestras de la leche (almacenamiento y presencia de conservante), se planteó la necesidad de realizar una evaluación sobre la influencia del tiempo de refrigeración (4-6 °C) y la presencia de azidiol en las muestras de leche sobre la respuesta de algunos de los métodos microbiológicos de cribado utilizados en España (BRT[®] AiM, Delvotest[®] Accelerator y Eclipse[®] 100) para la detección de los residuos de antibióticos más empleados en el tratamiento de la mastitis del ganado vacuno lechero.

Para realizar el estudio se plantearon dos experimentos y, en ambos, se utilizaron muestras de leche de vaca procedentes de distintas explotaciones. Las muestras se fraccionaron en 2 alícuotas: una sin conservante y otra con azidiol.

En el primer experimento se emplearon 3 antibióticos betalactámicos (amoxicilina, ampicilina y penicilina G) a concentraciones equivalente al LMR y la

oxitetraciclina a dos veces el LMR, debido a los límites de detección de los métodos. A continuación, las muestras de leche se analizaron a las 0, 12, 24, 36, 48, 72, 96 y 168 horas de refrigeración mediante los métodos microbiológicos de cribado BRT[®] AiM, Delvotest[®] Accelerator y Eclipse[®] 100. Con el fin de calcular la sensibilidad (n° muestras positivas/total análisis x 100) de los métodos a las diferentes tiempos de refrigeración.

En el segundo experimento se utilizaron 12 concentraciones para cada uno de los antibióticos seleccionados en el primer experimento. Estas concentraciones variaban en cada uno de los tres métodos microbiológicos utilizados, debido a los límites de detección. Y se analizaron a las 0, 24, 48 y 72 horas de refrigeración. Con el objetivo de calcular las pérdidas relativas de actividad antimicrobiana a partir del límite de detección calculado para cada método en muestras de leche sin refrigerar y sin azidiol.

Los resultados del primer experimento indican que la refrigeración durante 7 días no influyó en la sensibilidad de los métodos para los betalactámicos estudiados (amoxicilina, ampicilina y penicilina G) a concentraciones equivalentes al Límite Máximo de Residuos (LMR).

En el caso de la oxitetraciclina, que se estudio a concentraciones más elevadas (2LMR), el tiempo de refrigeración no influyó en los métodos BRT[®] AiM y Eclipse[®] 100 que presentaron sensibilidades elevadas durante todo el periodo, mientras que en el Delvotest[®] Accelerator ya en muestras sin refrigerar la sensibilidad fue baja (50%) y disminuyó todavía más a las 24 horas de refrigeración.

En el segundo estudio, el tiempo de refrigeración y la presencia de azidiol afectan de forma significativa a la frecuencia de resultados positivos de los antibióticos betalactámicos y de la oxitetraciclina, ya que en todos los casos el número de resultados positivos disminuyó al aumentar el tiempo de refrigeración. Sin embargo es importante resaltar que, en todo momento, los resultados positivos fueron más elevados en muestras de leche con azidiol.

Por otro lado, los límites de detección, calculados a partir de las muestras sin refrigerar y sin conservante, para los diferentes métodos, fueron 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.

Por último, las pérdidas de actividad antimicrobiana de la amoxicilina, ampicilina, penicilina G y oxitetraciclina aumentaron con el tiempo de conservación y fueron menores en las muestras con azidiol. Por otro lado, estas pérdidas en los

antibióticos betalactámicos se detectaron de una manera más evidente mediante los métodos microbiológicos cuya respuesta se basa en reacciones ácido-base (Delvotest[®] Accelerator y Eclipse[®] 100).

Dada la importancia que tiene la presencia de residuos de medicamentos en la leche para la Seguridad Alimentaria, se considera conveniente continuar estudiando los factores metodológicos que puedan influir sobre otros métodos de detección de inhibidores para disponer de herramientas fiables para evitar la llegada de residuos de medicamentos al consumidor y asegurar el cumplimiento de la legislación vigente.

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN	1
1. RESIDUOS DE ANTIMICROBIANOS EN LA LECHE	1
1.1. Utilización de antimicrobianos en producción animal.....	1
1.2. Principales antimicrobianos empleados en ganado vacuno lechero.....	1
1.3. Efectos de la presencia de residuos de antimicrobianos en la leche.....	2
2. CONTROL DE LA PRESENCIA DE ANTIBIÓTICOS EN LA LECHE	4
2.1. Límites Máximos de residuos.....	4
2.2. Sistemas de gestión de la trazabilidad de la leche.....	4
2.3. Métodos de detección de residuos.....	7
3. TOMA DE MUESTRAS DE LECHE PARA LA REALIZACIÓN DE CONTROLES OFICIALES	9
3.1. Consideraciones previas.....	9
3.2. Empleo de conservantes en las muestras.....	10
3.3. Refrigeración de las muestras de leche.....	12
II. OBJETIVOS	15
III. MATERIALES Y MÉTODOS	16
1. DISEÑO EXPERIMENTAL	16
2. MUESTRAS DE LECHE CON ANTIBIÓTICOS	16
3. MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS DE DETECCIÓN DE INHIBIDORES	18
3.1 Método Brilliant Black Reduction Test (BRT®).....	18
3.2 Método Delvotest® Accelerator.....	20
3.3 Método Eclipse®100.....	20
4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	21
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
1. EFECTO DE LA REFRIGERACIÓN SOBRE LA SENSIBILIDAD DE LOS MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS EN MUESTRAS DE LECHE SIN CONSERVANTE Y CON AZIDIOL	23
2. EFECTO DE LA REFRIGERACIÓN SOBRE LA PÉRDIDA DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS ANTIBIÓTICOS EN LA LECHE	27
2.1. Penicilinas.....	27
2.1.1. Amoxicilina.....	27
2.1.2. Ampicilina.....	37
2.1.3. Penicilina G.....	45
2.2. Oxitetraciclina.....	54
V. CONCLUSIONES	64
VI. BIBLIOGRAFIA	66

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Límites Máximos de Residuos en leche de vaca.....	5
Cuadro 2.	Sustancias antimicrobianas y concentraciones empleadas.....	19
Cuadro 3.	Sensibilidad del método BRT AiM [®] para los antibióticos betalactámicos y la oxitetraciclina.....	24
Cuadro 4.	Sensibilidad del método Delvotest [®] Accelerator para los antibióticos betalactámicos y la oxitetraciclina.....	25
Cuadro 5.	Sensibilidad del método Eclipse [®] 100 para los antibióticos betalactámicos y la oxitetraciclina.....	25
Cuadro 6.	Efecto de la concentración de amoxicilina, del tiempo de refrigeración y de la presencia de azidiol en las muestras de leche sobre la respuesta de los métodos microbiológicos..	27
Cuadro 7.	Ecuaciones de predicción para los métodos microbiológicos empleados en la detección de amoxicilina en la leche.....	27
Cuadro 8.	Efecto del tiempo de refrigeración sobre la respuesta de los métodos microbiológicos en muestras de leche con amoxicilina.....	28
Cuadro 9.	Efecto de la presencia de azidiol sobre la respuesta de los métodos microbiológicos en muestras de leche con amoxicilina.....	32
Cuadro 10.	Efecto del tiempo de refrigeración y del azidiol sobre el porcentaje de resultados positivos en los métodos microbiológicos para leche con amoxicilina.....	34
Cuadro 11.	Efecto de la concentración de ampicilina, del tiempo de refrigeración y de la presencia de azidiol en las muestras de leche sobre la respuesta de los métodos microbiológicos.....	37
Cuadro 12.	Ecuaciones de predicción para los métodos microbiológicos empleados en la detección de ampicilina en la leche.....	37
Cuadro 13.	Efecto del tiempo de refrigeración sobre la respuesta de los métodos microbiológicos en muestras de leche con ampicilina.....	41
Cuadro 14.	Efecto de la presencia de azidiol sobre la respuesta de los métodos microbiológicos en muestras de leche con ampicilina.....	42
Cuadro 15.	Efecto del tiempo de refrigeración y del azidiol sobre el porcentaje de resultados positivos en los métodos microbiológicos para leche con ampicilina.....	43
Cuadro 16.	Efecto de la concentración de penicilina G, del tiempo de refrigeración y de la presencia de azidiol en las muestras de leche sobre la respuesta de los Métodos microbiológicos.....	46
Cuadro 17.	Ecuaciones de predicción para los métodos microbiológicos empleados en la detección de penicilina G en la leche.....	46
Cuadro 18.	Efecto del tiempo de refrigeración sobre la respuesta de los métodos microbiológicos en muestras de leche con penicilina G.....	50
Cuadro 19.	Efecto de la presencia de azidiol sobre la respuesta de los métodos microbiológicos en muestras de leche con penicilina G.....	50
Cuadro 20.	Efecto del tiempo de refrigeración y del azidiol sobre el porcentaje de resultados positivos en los métodos microbiológicos para leche con penicilina G.....	52
Cuadro 21.	Efecto de la concentración de oxitetraciclina, del tiempo de refrigeración y de la presencia de azidiol en las muestras de leche sobre la respuesta de los métodos microbiológicos.....	54
Cuadro 22.	Ecuaciones de predicción para los métodos microbiológicos empleados en la detección de oxitetraciclina en la leche.....	55
Cuadro 23.	Efecto del tiempo de refrigeración sobre la respuesta de los métodos microbiológicos en muestras de leche con oxitetraciclina.....	55
Cuadro 24.	Efecto de la presencia de azidiol sobre la respuesta de los métodos microbiológicos en muestras de leche con oxitetraciclina.....	59
Cuadro 25.	Efecto del tiempo de refrigeración y del azidiol sobre el porcentaje de resultados positivos en los métodos microbiológicos para leche con oxitetraciclina.....	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Esquema de las diferentes etapas implicadas en el sistema de trazabilidad.....	7
Figura 2.	Métodos de detección de residuos de antimicrobianos en leche.....	8
Figura 3.	Procedimiento del método BRT [®] AiM.....	18
Figura 4.	Procedimiento del método Delvotest [®] Accelerator.....	20
Figura 5.	Procedimiento del método Eclipse [®] 100.....	21
Figura 6	Curvas dosis-respuestas del método BRT AiM [®] en la detección de amoxicilina en muestras de leche sin conservante.....	29
Figura 7.	Curvas dosis-respuesta del método BRT [®] AiM en la detección de amoxicilina en muestras de leche con azidiol.....	29
Figura 8.	Curvas dosis-respuesta del método Delvotest [®] Accelerator en la detección de amoxicilina en muestras de leche sin conservante.....	30
Figura 9.	Curvas dosis-respuesta del método Delvotest [®] Accelerator en la detección de amoxicilina en muestras de leche con azidiol.....	30
Figura 10.	Curvas dosis-respuesta del método Eclipse [®] 100 en la detección de amoxicilina en muestras de leche sin conservante.....	31
Figura 11.	Curvas dosis-respuesta del método Eclipse [®] 100 en la detección de amoxicilina en muestras de leche con azidiol.....	31
Figura 12.	Efecto del tiempo de refrigeración sobre las pérdidas relativas de actividad antimicrobiana (PAA) de amoxicilina leche sin conservante y con azidiol.....	35
Figura 13.	Curvas dosis-respuestas del método BRT AiM [®] en la detección de ampicilina en muestras de leche sin conservante.....	38
Figura 14.	Curvas dosis-respuesta del método BRT [®] AiM en la detección de ampicilina en muestras de leche con azidiol.....	38
Figura 15.	Curvas dosis-respuesta del método Delvotest [®] Accelerator en la detección de ampicilina en muestras de leche sin conservante.....	39
Figura 16.	Curvas dosis-respuesta del método Delvotest [®] Accelerator en la detección de ampicilina en muestras de leche con azidiol.....	39
Figura 17.	Curvas dosis-respuesta del método Eclipse [®] 100 en la detección de ampicilina en muestras de leche sin conservante.....	40
Figura 18.	Curvas dosis-respuesta del método Eclipse [®] 100 en la detección de ampicilina en muestras de leche con azidiol.....	40
Figura 19.	Efecto del tiempo de refrigeración sobre las pérdidas relativas de actividad antimicrobiana (PAA) de ampicilina leche sin conservante y con azidiol.....	44
Figura 20.	Curvas dosis-respuestas del método BRT AiM [®] en la detección de penicilina G en muestras de leche sin conservante.....	47
Figura 21.	Curvas dosis-respuesta del método BRT [®] AiM en la detección de penicilina G en muestras de leche con azidiol.....	47
Figura 22.	Curvas dosis-respuesta del método Delvotest [®] Accelerator en la detección de penicilina G en muestras de leche sin conservante.....	48
Figura 23.	Curvas dosis-respuesta del método Delvotest [®] Accelerator en la detección de penicilina G en muestras de leche con azidiol.....	48
Figura 24.	Curvas dosis-respuesta del método Eclipse [®] 100 en la detección de penicilina G en muestras de leche sin conservante.....	49
Figura 25.	Curvas dosis-respuesta del método Eclipse [®] 100 en la detección de penicilina G en muestras de leche con azidiol.....	49
Figura 26.	Efecto del tiempo de refrigeración sobre las pérdidas relativas de actividad antimicrobiana (PAA) de penicilina G leche sin conservante y con azidiol.....	53
Figura 27.	Curvas dosis-respuestas del método BRT AiM [®] en la detección de oxitetraciclina en muestras de leche sin conservante.....	56
Figura 28.	Curvas dosis-respuesta del método BRT [®] AiM en la detección de oxitetraciclina en muestras de leche con azidiol.....	56

Figura 29.	Curvas dosis-respuesta del método Delvotest® Accelerator en la detección de oxitetraciclina en muestras de leche sin conservante.....	57
Figura 30.	Curvas dosis-respuesta del método Delvotest® Accelerator en la detección de oxitetraciclina en muestras de leche con azidiol.....	57
Figura 31.	Curvas dosis-respuesta del método Eclipse® 100 en la detección de oxitetraciclina en muestras de leche sin conservante.....	58
Figura 32.	Curvas dosis-respuesta del método Eclipse® 100 en la detección de oxitetraciclina en muestras de leche con azidiol.....	58
Figura 33.	Efecto del tiempo de refrigeración sobre las pérdidas relativas de actividad antimicrobiana (PAA) de oxitetraciclina leche sin conservante y con azidiol.....	61

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1. RESIDUOS DE ANTIMICROBIANOS EN LA LECHE

1.1. Utilización de antimicrobianos en producción animal

Actualmente, existe 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.

Entre estas sustancias hay que destacar a los agentes antimicrobianos, que se definen, de forma general, como productos que son capaces de destruir o inhibir el crecimiento de otros microorganismos y, además, son efectivos a bajas concentraciones (Mateos, 2002).

Las recomendaciones de la Unión Europea (UE) sobre el uso prudente de agentes antimicrobianos en medicina humana (Recomendación 2002/77/CEE) y la prohibición paulatina por parte de la UE del uso de antibióticos como promotores del crecimiento han tenido consecuencias directas sobre el empleo de antimicrobianos en sanidad animal. En 1999, las cifras señaladas (IFAH, 2001) indicaban que tan sólo un 29% de antibióticos se emplearon en medicina veterinaria y solamente un 6% como promotores del crecimiento.

Sin embargo, a pesar de estas restricciones en el año 2005 (últimos datos disponibles), más del 15% del gasto mundial y más de 21% del gasto europeo en medicamentos veterinarios correspondió a sustancias antimicrobianas (IFAH, 2006),

Por otro lado, en cuanto a la distribución del consumo de los distintos grupos de antimicrobianos para uso terapéutico animal en Europa, aunque los datos disponibles están poco actualizados, se desprende que son las tetraciclinas con un 66% los antibióticos de mayor consumo seguidos de los macrólidos con un 12% y un 9% las penicilinas (IFAH, 1999).

1.2. Principales antimicrobianos empleados en ganado vacuno lechero

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

En el caso del vacuno lechero, la mastitis es una de las patologías más frecuentes que conlleva unas pérdidas económicas y gasto veterinario importantes (Gruet y col., 2001; Sawant y col., 2005). No es extraño, por lo tanto que la mayor

parte de los residuos de sustancias antibacterianas detectadas en la leche, procedan de terapias relacionadas con la glándula mamaria (hasta en un 90% de los casos), bien por tratamientos ligados a mamitis clínicas, o por tratamientos preventivos empleados en la fase de secado (Fabre y col., 1995; Erskine y col., 2003).

Con respecto a las sustancias empleadas en España para el tratamiento de la mamitis, Zorraquino y col. (2007) elaboraron un estudio para el entonces Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, actualmente Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino (MARM), en el cual se realizó una encuesta a veterinarios o equipos de veterinarios que trabajan en programas de mejora de calidad de leche y/o control de mamitis a lo largo de toda la geografía española, con el objetivo de evaluar la frecuencia de uso y riesgo de exposición a la presencia de residuos de antimicrobianos en vacuno lechero y, a su vez, el riesgo de aparición de residuos en la leche debido a estos tratamientos en la leche cruda de vaca en España.

Los resultados de las encuestas muestran que los antibióticos betalactámicos y los aminoglucósidos son los grupos de antimicrobianos para el tratamiento de las mamitis que más se utilizan, tanto en lactación como en secado, e incluso en los tratamientos inyectables. Los datos obtenidos muestran una gran correspondencia con otro estudio realizado por Zorraquino y col. (2007) en el cual se calcularon las frecuencias de utilización de moléculas antimicrobianas en España, durante el 2006, basándose en los preparados vendidos durante el año 2006 por los laboratorios asociados a Veterindustria para tratamientos intramamarios.

Sin embargo, hay que indicar que el uso de antimicrobianos también se encuentra ligado al tratamiento de otras enfermedades infecciosas del ganado vacuno, como metritis y afecciones podales (Zwald y col. 2004; Sawant y col. 2005), y que la leche de animales tratados para estas enfermedades también podría estar contaminada con residuos, si la gestión del tratamiento no se realiza correctamente.

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

La presencia en la leche de sustancias antimicrobianas, especialmente antibióticos, puede tener graves consecuencias tanto desde el punto de vista toxicológico como tecnológico.

El primer aspecto se refiere a la salud pública, ya que su presencia puede producir efectos negativos sobre la salud humana, provocando perturbaciones pasajeras en la flora intestinal, desarrollo de antibiorresistencias a las bacterias patógenas y reacciones alérgicas que puede, en casos extremos, llevar a la anafilaxia (Moretain, 1996; Anthony y col., 2001; Demoly y Romano, 2005).

Los principales problemas que se pueden presentar desde el punto de vista de la salud pública son:

- 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.
- Desarrollo de resistencia a agentes antibacterianos como resultado de la exposición repetida de las bacterias a dichas sustancias.

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), lo que agrava el problema para la salud pública.

Hay que tener en cuenta, que desde un punto de vista tecnológico, la presencia de sustancias farmacológicas en la leche cruda afecta a los procesos bacterianos en la elaboración de productos fermentados como queso y yogur se ralentizan, pudiendo retrasar la acidificación, una mayor dificultad en el cuajado y la maduración (Mourot y Loussouarn, 1981; Brady y Katz, 1987; Suhren, 1995), llegando incluso a inhibirse completamente por causa de los residuos de antibióticos, ya que afectan a la flora láctica dando lugar a procesos de mala calidad (Packham y col., 2001).

También, 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 gérmenes patógenos, falseando así la calidad higiénica de la leche (Moretain, 1996).

Tampoco hay que olvidar la importancia que tiene la presencia de residuos para el propio ganadero, ya que puede llevar a la inmovilización y posterior destrucción de la leche en caso de resultados “no conformes” por parte de las autoridades, al ser calificada como “*no apta para consumo humano*” según el Reglamento 853/2004/CEE.

2. CONTROL DE LA PRESENCIA DE ANTIBIÓTICOS EN LA LECHE

2.1. Límites Máximos de Residuos

Para controlar la presencia de residuos de medicamentos en los alimentos, la UE ha establecido los Límites Máximos de Residuos (LMR) que define en el Reglamento 2377/90/CEE como “el contenido máximo de concentración de residuos resultante de la utilización de un medicamento veterinario (expresado en µg/kg o g/kg sobre la base del peso en fresco) autorizada en la Comunidad o reconocida como admisible en un producto alimenticio”.

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

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

En el Cuadro 1 se indican los diferentes LMRs recogidos en la Legislación Europea, para sustancias quimioterapéuticas y muchos de los antibióticos utilizados en ganado lechero de acuerdo con el Reglamento 2377/90/CEE y sucesivas modificaciones.

2.2. Sistemas de gestión de la trazabilidad de la leche (“Letra Q”)

El Reglamento 178/2002/CEE del Parlamento Europeo y del Consejo, establece 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 Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPYA), actualmente Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino (MARM), publicó el

Cuadro 1. Límites Máximos de Residuos en leche de vaca

Antimicrobianos	LMR*	Antimicrobianos	LMR
Betalactámicos		(cont.)	
Bencilpenicilina	4	Sulfadimetoxipiridazina	100
Ampicilina	4	Macrólidos/lincosamidas	
Amoxicilina	4	Eritromicina	40
Penetamato	4	Espiramicina	200
Nafcilina	30	Tilmicosina	50
Cloxacilina	30	Tilosina	50
Dicloxacilina	30	Lincomicina	150
Oxacilina	30	Pirlimicina	100
Cefacetrilo	125	Aminoglucósidos	
Cefalexina	100	Gentamicina	100
Cefalonio	20	Kanamicina	150
Cefoperazona	50	Neomicina	1500
Ceftiofur	100	Espectinomicina	200
Cefquinoma	20	DH/Estreptomicina	200
Cefapirina	60	Quinolonas	
Cefazolina	50	Danofloxacina	30
Tetraciclinas		Enrofloxacina	100
Clortetraciclina	100	Flumequina	50
Oxitetraciclina	100	Marbofloxacina	75
Tetraciclina	100	Otros	
Sulfonamidas		Acido clavulánico	200
Sulfadiacina	100	Bacitracina	100
Sulfadimetoxina	100	Baquiloprim	30
Sulfadimidina	100	Colistina	50
Sulfadoxina	100	Novobiocina	50
Sulfanilamida	100	Rifaximina	60
Sulfametazina	100	Tianfenicol	50
Sulfatiazol	100	Trimetoprima	50

*LMR: $\mu\text{g}/\text{kg}$ Fuente: <http://sinaem.agemed.es/lmrs> (Febrero, 2008)

Real Decreto 217/2004, donde 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. Este Real Decreto creó la herramienta que permite establecer la trazabilidad en la leche cruda de vaca en España, mediante el Módulo de trazabilidad de la "base de datos Letra Q" (LEche TRAzabilidad Calidad), 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 productora hasta que llega a un centro lácteo de transformación.

En la Figura 1 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 a consumo humano (Reglamentos 854 y 882/2004/CEE), el MAPYA publicó el Real Decreto 1728/2007.

En el Real Decreto 1728/2007 se establece 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 el ámbito de las exigencias de calidad de la producción de la leche modificando el Real Decreto 217/2004.

Es obligatorio realizar en los controles en la explotación, antes de cargar la leche cruda en la cisterna de transporte, y en el centro lácteo, antes de descargar la leche en los silos de almacenamiento, 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 hay que realizar la prueba de acidez. En ambos controles se recogerán muestras obligatorias que se analizarán en los laboratorios, determinando la calidad comercial y calidad higiénico-sanitaria.

También hay que realizar una prueba de detección de residuos de antibióticos “in situ” en la explotación antes de cargar la leche en la cisterna y en el centro lácteo antes de descargar la leche de las cisternas de transporte.

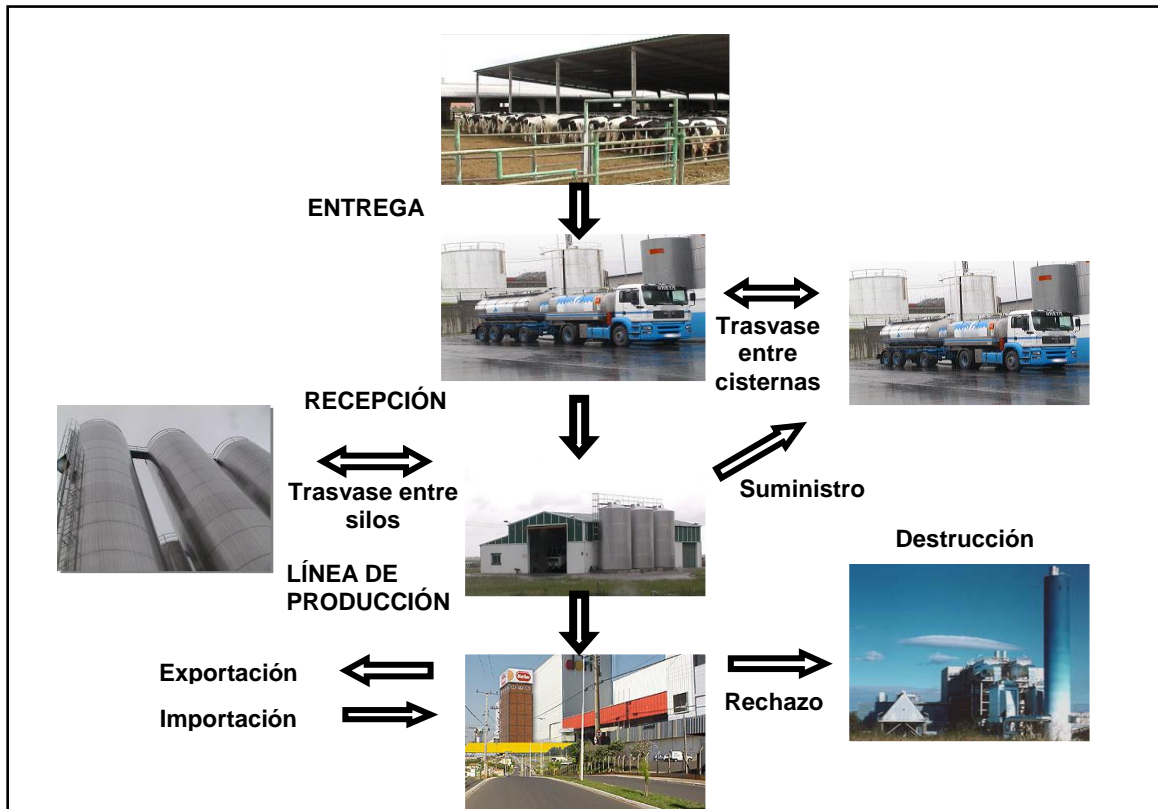


Figura 1. Esquema de las diferentes etapas implicadas en el sistema de trazabilidad

Fuente: MAPYA (2006)

En la explotación se realizarán pruebas que, al menos detecten antibióticos de los grupos betalactámicos y tetraciclinas. En el centro lácteo se realizará una prueba para la detección de betalactámicos en todas las cisternas de transporte y una prueba de detección de residuos de tetraciclinas, en una de cada cinco cisternas de transporte de leche.

Todos los resultados analíticos se comunicarán diariamente a la base de datos "Letra Q". En caso de incumplimientos a la prueba de inhibidores, se procederá a la inmovilización de la leche y a su posterior destrucción.

2.3. Métodos de detección de residuos

La Directiva 96/23/CE establece que los Estados Miembros de la UE deberán vigilar la presencia de residuos de antibióticos y de otros medicamentos veterinarios en la leche dentro de un Plan Nacional de Investigación de Residuos. Además para cumplir con los Reglamentos (CEE) 852, 853 y 854/2004 es necesario el control de la presencia de residuos en la leche para asegurar la calidad de las materias primas.

La Unión Europea a partir de la Decisión 2002/657/CEE clasifica los métodos analíticos de detección de sustancias inhibidoras en la leche como métodos

cualitativos o cuantitativos en función de las características de funcionamiento de cada uno de ellos (Figura 2).

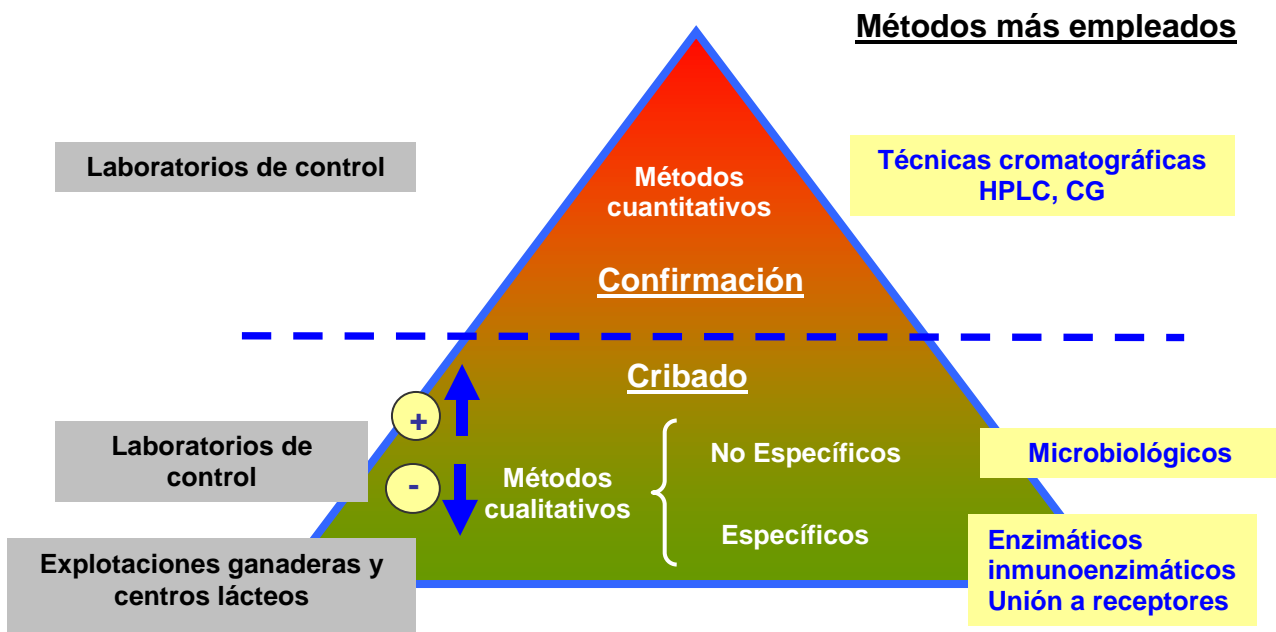


Figura 2. Métodos de detección de residuos de antimicrobianos en leche

En el control de la presencia de residuos de antibióticos se diferencian dos etapas: Una primera etapa en la que se realiza un control primario de cribado y de confirmación preliminar donde se utilizan en especial métodos microbiológicos cualitativos cuya finalidad es establecer la presencia o ausencia de residuos por encima de los LMRs, y métodos de confirmación preliminar que son capaces de identificar sustancias o incluso familias de antimicrobianos de una forma más específica.

Y una segunda etapa de confirmación y cuantificación que se emplean métodos físico-químicos que se utilizan para cuantificar de una forma inequívoca la presencia de estos residuos y determinar exactamente la cantidad de analito presente en las muestras. Las técnicas cromatográficas son las que se emplean con mayor frecuencia, siendo la más utilizada la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, conocida como HPLC.

En España el RD 1728/2007 establece la obligatoriedad de realizar pruebas "in situ" de detección de antibióticos en las explotaciones antes de cargar la leche en las cisternas y en el centro lácteo antes de descargar la leche, además se detalla que estos métodos deben ser específicos capaces de detectar la amoxicilina y ampicilina en todas las cisternas y la oxitetraciclina cada cinco cisternas y desde un punto de

vista práctico se necesita que estos métodos sean rápidos, por ello se utilizan métodos enzimáticos o de unión a receptores ya que son específicos de una sustancia o grupo, muy rápidos y de fácil manejo. Los más utilizados en España son el Beta Star, TwinSensor y el SNAP, entre otros.

En los laboratorios de control este Real Decreto 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. Por ello, se emplean métodos microbiológicos los cuales indican la presencia o ausencia de residuo, son baratos y de fácil manejo. Los más utilizados en España son el BRT-AiM[®], Delvotest[®] y Eclipse[®].

3. TOMA DE MUESTRAS DE LECHE PARA LA REALIZACIÓN DE CONTROLES OFICIALES

3.1. Consideraciones previas

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 su conservación. Posteriormente, en España el Real Decreto 1728/2007 también establece los requisitos y condiciones que se deben cumplir en la toma de muestras procedentes del tanque de refrigeración de la explotación y de la cisterna de transporte, para analizarlas en los laboratorios de control, y las condiciones de almacenamiento y transporte de las muestras de leche hasta su llegada al laboratorio de control.

La toma de muestras tiene como objetivo obtener una muestra representativa del volumen total de leche que contiene el tanque o la cisterna. En el citado Real Decreto se señala que antes de tomar la muestra hay que homogenizar convenientemente la leche del tanque o cisterna, para conseguir una buena mezcla de todos los componentes especialmente de la grasa, células somáticas y gérmenes; para facilitar que la muestra sea lo más representativa posible y estas deben ser identificadas correctamente con etiquetas.

En la explotación la toma de muestras será realizada por el tomador de muestras, se recogerán al menos, las muestras necesarias para garantizar un mínimo de muestras válidas al mes para cada parámetro: grasa, proteína, extracto seco magro y colonias de gérmenes a 30 °C. Excepto para el estudio de las células somáticas, para el cual se garantizará al menos una muestra válida al mes, además se realizará

“in situ” una prueba de detección de residuos de antibióticos. Las muestras serán tomadas del tanque de almacenamiento de la leche y serán almacenadas y transportadas en refrigeración hasta el laboratorio de análisis. Las muestras serán marcadas 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.

Por otro lado, en los controles obligatorios en los centros lácteos la toma de muestras será realizada por el técnico de calidad del centro lácteo. Se recogerán dos muestras de todas las cisternas a su llegada al centro lácteo antes de su descarga, una de las muestras se enviara al laboratorio de análisis donde se determinará el punto crioscópico, grasa, proteína, extracto seco magro, células somáticas, colonias de gérmenes a 30°C y presencia de residuos de antibióticos y la otra muestra servirá para la realización “in situ” de una prueba de detección de residuos de antibióticos. Se deberán identificar con una etiqueta individual para identificar la muestra de leche y comunicar los resultados de los análisis a la “base de datos Letra Q”.

También el Real Decreto señala que podrá añadirse a la muestra de leche azidiol para su conservación, con una dosificación, para 40 ml de leche de 133 µl o composición equivalente de una solución de azidiol, con una composición especificada en el “Módulo de Calidad Letra Q” (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).

Además, establece que durante el transporte y almacenamiento de las muestras de leche, la temperatura de conservación hasta su llegada a los laboratorios de análisis no podrá ser inferior a 0 °C ni superior a 4 °C en caso de no adicionar conservante a la muestra de leche, pero si el tiempo transcurrido entre la toma de muestras y el análisis es inferior a 24 horas la temperatura de conservación podrá elevarse a 6 °C y a 8 °C en caso de adicionarse conservante para impedir el crecimiento microbiano.

3.2. Empleo de conservantes en las muestras de leche

La utilización de conservantes en las muestras de leche puede crear interferencias con los métodos de detección de inhibidores, especialmente con los de tipo microbiológico, ya que dependiendo de su composición pueden retrasar o inhibir el crecimiento microbiano.

Según Muller y Jones (1993) la sobredosificación de muestras de leche con ácido bórico o incluso empleándolo a niveles normales (Schiffmann y col., 1992) puede provocar fallos en la reducción del color dando resultados dudosos o positivos.

Zorraquino (1997) realizó un estudio sobre la influencia del efecto de la adición de azidol como conservante de las muestras de leche de vaca, sobre las lecturas fotométricas de las respuestas 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.

A partir de los resultados del citado estudio se pudo deducir que la presencia de azidol parece presentar lecturas de absorbancia más elevadas que aquellas sin conservantes y que, en todos los casos, las lecturas fueron superiores en los tiempos más bajos de incubación (2 h 30 min.), disminuyendo sus valores conforme el tiempo de análisis aumenta.

Molina y col. (1999) obtienen una disminución en la frecuencia relativa porcentual de casos positivos en el método BRT[®], al utilizar muestras de leche de cabra con azidol y prolongar el tiempo de incubación del método desde 3.00 hasta 3.30 o 4.00 horas

También Molina y col. (2003a) en otro estudio sobre el efecto del uso de dos conservantes, dicromato potásico y azidol, sobre la respuesta del método BRT[®] AiM Y Delvotest[®] en la leche de oveja dedujeron que el dicromato potásico inhibía totalmente el crecimiento del *Geobacillus stearothermophilus* mientras que con el azidol se obtenía una selectividad del 90,2% para el BRT[®] AiM y del 91% en el Delvotest[®], valores inferiores a los obtenidos en muestras sin conservante. Esas mismas muestras calentadas a 82 °C durante 10 minutos, mejoraron la selectividad del método hasta un 94,8% y un 95,3%, respectivamente. Poniendo de manifiesto la mejora de los resultados con el calentamiento de las muestras previo al análisis para reducir la incidencia de resultados “falsos positivos”.

Otros autores (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[®] “100ov”, no encontrándose resultados “falsos positivos”, sin embargo estos autores señalan una incidencia significativa de resultados dudosos en las muestras que contenían conservante (8,6%) en comparación con las muestras sin conservante (0,6%).

En un estudio más reciente sobre el efecto de la presencia de azidol sobre los métodos microbiológicos CMT Copan[®], Delvotest[®] MCS y Eclipse[®] en muestras de

leche de oveja, Roca y col. (2007), concluyeron que la presencia de azidiol no influyó sobre la selectividad y sensibilidad de los métodos siempre que se prolongue la incubación 15 minutos más del tiempo recomendado por el fabricante.

Para evaluar la robustez y fiabilidad del test Eclipse la casa comercial Zeu-Immunotec, SL, en el año 2008, realizó una reevaluación de la sensibilidad del test en un amplio grupo de antimicrobianos a diferentes concentraciones, además las muestras de leche se suplementaron con azidiol. Obtuvieron un ligero aumento del tiempo de viraje, con respecto a muestras de leche sin azidiol (10-15 minutos) debido a las propiedades inhibitorias del conservante y la sensibilidad a algunos antibióticos se ve ligeramente incrementada.

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 estos retrasan el deterioro de la muestra de leche contribuyendo a mantener sus propiedades físico-químicas hasta su llegada a los laboratorios de control.

3.3. Refrigeración de las muestras de leche

La leche recogida en la granja debe mantenerse refrigerada a una temperatura entre 4 y 6 °C, o hasta 8 °C si la recogida es diaria (RD 1728/2007), hasta su llegada a la industria donde se almacena en grandes silos refrigerados, hasta su posterior procesado.

También las muestras obtenidas en granjas y cisternas para comprobar la calidad físico-química de la leche, se envían a los laboratorios de control manteniendo la cadena de frío, donde pueden ser analizadas en el momento de su recepción o permanecer refrigeradas 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.

Por ello, la Decisión 2002/657/CEE sobre el funcionamiento de métodos analíticos e interpretación de resultados, especifica que una de las características comunes de funcionamiento de un método para su validación, es la determinación de la estabilidad del analito tanto en las soluciones patrón como en la matriz empleada, en condiciones de refrigeración (4 °C), congelación (-20 °C) y temperatura ambiente (20 °C).

En el caso concreto de la leche la información existente sobre la influencia de las condiciones y el tiempo de almacenamiento en frío sobre la estabilidad y

degradación de sustancias antimicrobianas es limitada y se refiere solamente a algunos antibióticos, además los estudios se centran sobretodo en técnicas cromatográficas.

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

Por en contrario, Haagsma (1993), demostró que aproximadamente el 60% de penicilina G en leche se destruye dentro de las 48 h a 2 °C, y que esta cifra de pérdida de actividad alcanza el 75% cuando la temperatura de conservación empleada es de 22 °C (Guay y col., 1987).

En cuanto al efecto del almacenamiento a 4 °C y -70 °C, sobre la estabilidad de la ampicilina en leche mediante una técnica LC-FL, fue estudiado por Schenk y col. (2000). Estos autores no obtuvieron ninguna pérdida significativa en la concentración de ampicilina bajo ninguna de las dos condiciones de almacenamiento durante 6 días.

En cambio, Riediker y col. (2004) que estudiaron la estabilidad de 4 betalactámicos (amoxicilina, cloxacilina, oxacilina y penicilina G) en muestras y extractos de leche conservados a bajas temperaturas, mediante LC-ESI-MS/MS. Obtienen para las muestras de leche indicaron una degradación 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 análisis sobre la influencia de las condiciones de almacenamiento sobre la estabilidad de las penicilinas en la leche, empleando HPLC para la cuantificación de las pérdidas, obtiene que la penicilinas son moléculas que presentan porcentajes de degradación elevados cuando las muestras de leche son refrigeradas a 4 °C.

En el caso de estudios realizados con tetraciclinas, autores como Podhorniak y col. (1999) evaluaron la estabilidad de las tetraciclinas bajo condiciones de almacenamiento de la leche. Para ello, fortificaron las muestras de leche con 50 µg/kg de tetraciclinas y las analizaron por HPLC después de ser mantenidas a 4 y 25 °C durante 24, 48 y 72 horas. No se 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, evaluó la estabilidad de los antibióticos en los extractos obtenidos y refrigerados a 4 °C en la oscuridad, concluyendo que bajo estas condiciones, solo fueron estables durante una semana de almacenamiento.

Recientemente, Spisso y col. (2007), evaluaron también la estabilidad de la clortetraciclina, oxitetraciclina y tetraciclina en muestras de leche de oveja 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 reciente sobre la estabilidad de la oxitetraciclina en 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 obtuvo un efecto significativo del tiempo de refrigeración a 4 °C sobre la estabilidad de tetraciclinas en la leche, ya que las concentraciones disminuían conforme aumentaba el tiempo de refrigeración.

Los estudios realizados sobre el efecto de la refrigeración de las muestras de leche sobre los métodos microbiológicos de cribado son muy escasos, así en un estudio realizado por Roca y col. (2007) sobre el efecto de la conservación de las muestras de leche de oveja (4-6 °C) 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 resisten mejor la refrigeración.

La importancia que tiene tanto para la industria láctea, como para el productor de leche y la seguridad alimentaria la posible interferencia del tiempo de refrigeración de la leche sobre los métodos microbiológicos de detección de antimicrobianos, plantea la necesidad de llevar a cabo estudios que evalúen el efecto que causan los tiempos de refrigeración así como, el efecto de la presencia de azidiol en las muestras de leche, ya que como se ha expuesto estos factores pueden interferir en los resultados de los métodos empleados en la detección de los residuos de medicamentos.

II. OBJETIVOS

La presencia de residuos de medicamentos veterinarios en la leche supone un riesgo para la salud pública, además de ocasionar problemas en la industria láctea por su influencia negativa en los procesos de elaboración de algunos productos lácteos.

Dada la importancia de estos residuos se ha establecido su control dentro de los sistemas de gestión de la trazabilidad y la calidad de la leche cruda de vaca (R.D 217/2004 y R.D 1728/2007), donde se establece la normativa referente a la toma de muestras y las pruebas de detección, de residuos de antimicrobianos en la leche.

Además, la información disponible sobre el efecto de los factores relacionados con la toma de muestras, como el tiempo de refrigeración a lo largo de las etapas de producción, transporte y análisis, así como el uso de azidol como conservante de la leche sobre los métodos de detección de inhibidores es muy limitada.

Por ello, el objetivo general de este trabajo ha sido estudiar el efecto de los factores relacionados con la toma de muestras de leche (conservante y almacenamiento), sobre la respuesta de algunos de los métodos microbiológicos de cribado más utilizados en España (BRT[®] AiM, Delvotest[®] Accelerator y Eclipse[®] 100) en la detección de los antibióticos señalados en el R.D 1728/2007 (amoxicilina, ampicilina y oxitetraciclina), así como la penicilina G debido a su frecuencia de uso en vacuno lechero. De modo más específico, los objetivos planteados en el estudio han sido:

- Evaluar la influencia del tiempo de refrigeración y la presencia de azidol en las muestras de leche sobre la sensibilidad de los métodos microbiológicos para 3 antibióticos betalactámicos y la oxitetraciclina.

- Estudiar el efecto del tiempo de refrigeración en las muestras de leche sin conservante y con azidol sobre la pérdida de actividad antimicrobiana de los métodos microbiológicos de cribado para 3 antibióticos betalactámicos y la oxitetraciclina.

De este modo se pretende conocer la influencia de los factores relacionados con la toma de muestras de leche sobre los métodos microbiológicos de cribado, a fin de mejorar los protocolos de análisis para la detección de residuos de medicamentos en la leche.

MATERIAL Y MÉTODOS

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. DISEÑO EXPERIMENTAL

Dado que el presente estudio pretende evaluar la influencia del tiempo de refrigeración y la presencia de azidiol en las muestras de leche sobre la respuesta de algunos de los métodos microbiológicos de detección de residuos de antimicrobianos en la leche más utilizados en España, para diferentes sustancias antimicrobianas pertenecientes a los grupos de antibióticos betalactámicos y tetraciclinas, el estudio se realizó como se expone a continuación.

El estudio se planteo en base a la realización de dos experimentos, en cada uno de ellos se utilizaron muestras procedentes de la leche de tanque de diferentes explotaciones de vacuno lechero:

- Las muestras de leche se fraccionaron en 2 alícuotas: una sin conservante y otra con azidiol, a las que se les adicionaron concentraciones equivalentes al LMR y en aquellos casos de los antibióticos no detectados a esa concentración, se ensayaron concentraciones mayores al LMR para proceder al cálculo de la sensibilidad con los 4 antibióticos seleccionados para este estudio. A continuación, las muestras de leche se analizaron a las 0, 12, 24, 36, 48, 72, 96 y 168 horas de refrigeración a 4 °C mediante los métodos microbiológicos de cribado BRT[®] AiM, Delvotest[®] Accelerator y Eclipse[®] 100 evaluando los resultados visualmente como negativos y positivos.
- Un segundo experimento en el que las muestras de leche se fraccionaron en dos alícuotas: una sin conservante y otra con azidiol, y se les adicionaran 12 concentraciones con los mismos 4 antibióticos utilizados en el primer experimento. Con el objetivo de calcular los límites de detección y poder estimar las posibles pérdidas relativas de actividad antimicrobiana, a las 0, 24, 48 y 72 horas de almacenamiento a 4 °C de la leche, mediante los métodos microbiológicos citados anteriormente.

2. MUESTRAS DE LECHE CON ANTIBIÓTICOS

Las muestras de leche fueron recogidas por personal de empresa DANONE S.A con una frecuencia semanal, de la planta situada en el polígono de Aldaia (Valencia).

A continuación las muestras de leche fueron llevadas al Laboratorio Interprofesional Lechero de la Comunidad Valenciana (LICOVAL) para el análisis de su composición en grasa, proteína, el recuento de células somáticas y bacteriología,

garantizando que cumplieran con los requisitos de composición y calidad señalados en la norma ISO/FDIS 13969 (2002) "Guía para la descripción normalizada de métodos microbiológicos de cribado".

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 bacteriología 9.000 y 100.000 u.f.c/mL.

Posteriormente, las muestras se homogenizaron y dividieron cada una de ellas en 2 alícuotas correspondientes a 1 litro sin conservante y otro con azidiol. El conservante utilizado fue el azidiol, debido a que su uso está muy extendido en la toma de muestras y análisis de los laboratorios en España y se preparó siguiendo las recomendaciones del protocolo "Módulo de Calidad Letra Q" publicado por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA, 2007).

Para obtener un litro de azidiol se disolvieron 0,75 g de cloranfenicol en 10 ml de etanol al 96%, añadiendo seguidamente 900 ml de agua destilada. A continuación se incorporó 18 g de azida sodica y para estabilizar el valor del pH se añadió 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 enfrió y se enrasó con agua estéril a 1000 ml, utilizando como colorante 35 mg de azul de bromofenol. La dosis empleada fue de 33 µl por cada 10 ml de leche.

En el primer experimento cada una de estas alícuotas se dividieron en 120 partes de 5 ml y se fortificaron con los antibióticos seleccionados a tres concentraciones utilizando las mismas para los tres métodos empleados. A continuación las muestras de leche se analizaron por duplicado mediante los métodos microbiológicos BRT® AiM, Delvotest® Accelerator y Eclipse® 100 el mismo día de su recogida (0 horas), a las 12, 24, 36, 48, 72, 96 y 168 horas de refrigeración a 4 °C.

Para el segundo estudio se utilizaron 12 concentraciones diferentes para cada uno de los antibióticos, estas variaban para cada método según los límites de detección del mismo presentados por las diferentes casas comerciales. Posteriormente, se analizaron a las 0, 24, 48 y 72 horas de refrigeración a 4 °C.

En el Cuadro 2 se presentan los antibióticos utilizados, junto con las concentraciones empleadas en cada uno de los experimentos realizados, así como el disolvente utilizado y la referencia de la casa comercial.

Las muestras adicionadas, con cada uno de los antibióticos estudiados, se prepararon siguiendo las recomendaciones de la Federación Internacional de Lechería

(FIL, 1991), de modo que el volumen de disolución de un fármaco determinado no superase al 1% del volumen de solución final de leche resultante.

Para la preparación de las disoluciones se pesó en una balanza 0,1 g de cada sustancia, teniendo en cuenta su pureza, disolviéndose en un matraz de 100 mL usando el disolvente más adecuado para cada sustancia, obteniéndose así soluciones madre de cada antibiótico con una concentración de 100 mg/100 mL. Partiendo de dicha disolución se prepararon soluciones intermedias para conseguir las concentraciones a ensayar.

3. MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS DE DETECCIÓN DE INHIBIDORES

3.1. Método Brilliant Black Reduction Test (BRT®)

El método BRT® AiM (AiM, Munich, Alemania) corresponde a la versión sin predifusión empleado en este estudio. Está adaptado para su uso en microplacas de 96 pocillos y utiliza el negro brillante como indicador redox.

Para realizar el test se necesita un volumen de leche de 100 µL para cada pocillo, sellar con una lámina adhesiva transparente e incubar en baño de agua o incubador proporcionado por la casa fabricante (Thermoblock AiM) a 64 ± 1 °C durante 3 horas. En cada placa, es necesario añadir un control positivo con una cantidad de 10 µg/kg de penicilina.

Después de la incubación se realiza una lectura del test visualmente considerando la muestra de leche negativa si el color púrpura del pocillo vira a color amarillo-crema y positiva si no cambia de color.

En la Figura 3 se muestra un esquema del procedimiento llevado a cabo para el método BRT® AiM.



Figura 3. Procedimiento del test BRT® AiM

Cuadro 2. Sustancias antimicrobianas y concentraciones empleadas

Sustancias antimicrobianas		Concentración 1 ^{er} experimento (µg/Kg)	Concentración 2 ^o experimento (µg/Kg)			Disolvente	Ref, comercial
Penicilinas	LMR (µg/Kg)		Método	L.D (µg/Kg)			
Amoxicilina	4	4	BRT [®] AiM	3-4	0 / 0,25 / 0,5 / 0,75 / 1 / 1,25 / 1,5 / 1,75 / 2 / 2,25 / 2,5 / 2,75	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	4	4	BRT [®] AiM	4	0 / 0,25 / 0,5 / 0,75 / 1 / 1,25 / 1,5 / 1,75 / 2 / 2,25 / 2,5 / 2,75	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	4	4	BRT [®] AiM	2-3	0 / 0,25 / 0,5 / 0,75 / 1 / 1,25 / 1,5 / 1,75 / 2 / 2,25 / 2,5 / 2,75	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	LMR (µg/Kg)		Método	L.D (µg/Kg)			
Oxitetraciclina	100	200	BRT [®] AiM	100	0 / 30 / 35 / 40 / 45 / 50 / 55 / 60 / 65 / 70 / 75 / 80	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 proporcionado por la casa comercial

3.2. Método Delvotest[®] Accelerator

El Delvotest[®] Accelerator (DSM Food Specialties, Delf, Holanda) se presenta en formato microplaca de 96 pocillos y cada una de ellas contiene púrpura de bromocresol como colorante e indicador.

Para la realización del test hay que colocar 100 μ L de muestra en cada pocillo e incubar en el escáner-incubador proporcionado por la casa (DELVO[®] SCAN) con capacidad para 4 placas individuales, donde cada una se incuba de forma independiente.

La temperatura de incubación es de 64 °C y el tiempo necesario para obtener resultados fiables es de aproximadamente 100 minutos. En cada placa es necesario colocar una muestra con 10 μ g/kg de penicilina como control positivo.

Los resultados se leen e interpretan automáticamente por el escáner del equipo que realiza lecturas del cambio de color de los pocillos cada minuto, y establece un valor “cut-off” a partir del cual interpreta los resultados como negativos o positivos.

En la Figura 4 se muestra el procedimiento empleado para la realización del método Delvotest[®] Accelerator.

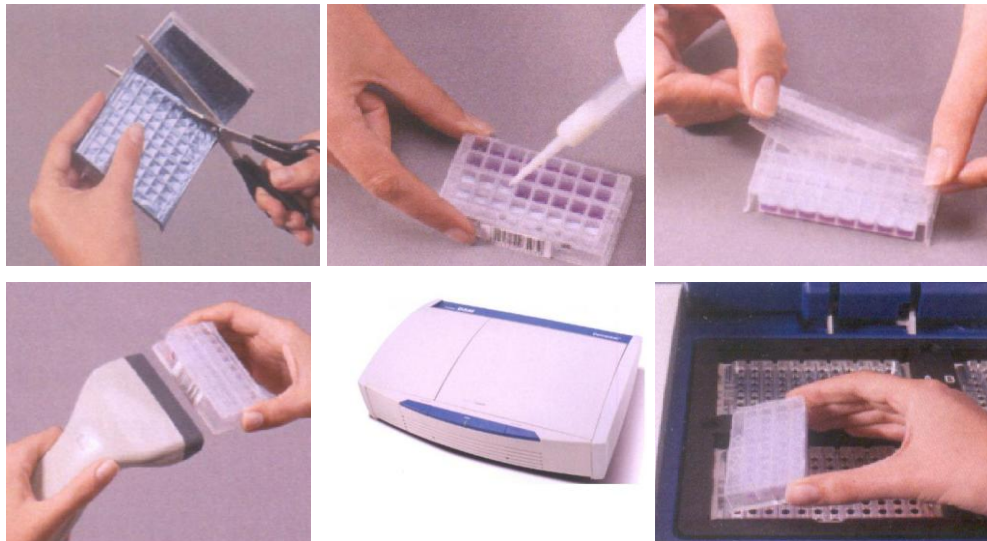


Figura 4. Procedimiento del método Delvotest[®] Accelerator

3.3. Método Eclipse[®] 100

El método Eclipse[®] 100 (Zeu-Inmunotec, Zaragoza, España) utilizado en este estudio se presenta en formato microplaca de 96 pocillos y utiliza el púrpura de bromocresol como colorante e indicador.

Para la realización del test, se colocan 100 μ L de muestra fortificada en cada pocillo de la placa junto a una muestra de leche cruda como control negativo y otra muestra con 10 μ g/kg de penicilina como control positivo. La placa se sella con una lámina adhesiva realizando una preincubación a temperatura ambiente durante una hora, y después se lava tres veces con agua destilada antes de incubarla en baño de agua o incubador proporcionado por la casa (FX Incubator) a 65 ± 1 °C durante 2 horas y 30 minutos.

A continuación, los resultados se interpretan de forma visual en la cara inferior de la placa, calificando los resultados de la siguiente forma:

- color amarillo: negativo
- color violeta: positivo



En la figura 5 se presenta un resumen del procedimiento empleado para el Eclipse® 100.



Figura 5. Procedimiento del método Eclipse® 100

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En el primer experimento a partir de los resultados obtenidos se calculó la sensibilidad (n° resultados positivos/total de análisis x 100).

En el segundo se calcularon los límites de detección (concentración que produce un 95% de resultados positivos) siguiendo el criterio establecido en la norma ISO 1369:2003.

Para realizar el calculo de los límites de detección, se utilizó un modelo de regresión logística multinominal, debido a que el modelo de regresión lineal no es adecuado cuando se utiliza una escala ordinal a dos niveles (negativo y positivo).

Por ello se aplicó el procedimiento LOGISTIC del paquete estadístico SAS® (SAS, 2001).

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

$$L_{ijkl} = \text{logit} [P_{ijkl}] = \beta_0 + \beta_1 C_i + \beta_2 R_j + \beta_3 A_k + \varepsilon_{ijkl} \quad (\text{Ecuación I})$$

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 $A=1$ y ε_{ijk} = error residual.

Con el propósito de evaluar la pérdida relativa de la actividad antimicrobiana de los antibióticos en la leche en la medida que transcurre el tiempo de refrigeración, se decidió trabajar en una zona de la curva dosis-respuesta donde cada método de screening posea buena sensibilidad para medir esta propiedad. Por ello, se eligió el Límite de Detección (LD) de cada fármaco como la concentración que produce el 95% de resultados positivos en las muestras de leche sin conservante y sin refrigerar.

Posteriormente, haciendo uso de la Ecuación I, se calculó para antibiótico y tiempo de refrigeración, la frecuencia de resultados positivos al método (FR_j) cuando el analito está presente en la muestra de leche a un nivel equivalente a su LD, mediante la siguiente ecuación:

$$FR_j = \left[\frac{e^{(\beta_0 + \beta_1 LD + \beta_2 R_j + \beta_3 A)}}{1 + e^{(\beta_0 + \beta_1 LD + \beta_2 R_j + \beta_3 A)}} \right] \quad (\text{Ecuación II})$$

Haciendo uso de las frecuencias de resultados positivos a tiempo cero (95%) y a diferentes tiempos de refrigeración (FR_j), se calculó la pérdida relativa porcentual de actividad antimicrobiana mediante la siguiente expresión:

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

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el propósito de evaluar el efecto del tiempo de refrigeración y la presencia de azidiol en las muestras de leche sobre la sensibilidad de los métodos BRT AiM[®], Delvotest[®] Accelerator y Eclipse[®] 100 y, por otra parte calcular las pérdidas relativas de actividad antimicrobiana, se realizó un ensayo para la amoxicilina, ampicilina y oxitetraciclina, dado que en el RD 1728//2007 se 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 para la penicilina G dada su frecuencia de utilización en ganado vacuno lechero (Zorraquino y col. 2007).

El estudio se dividió en dos experimentos, en cada uno de ellos las muestras de leche se fraccionaron en 2 alícuotas diferentes: una sin conservante y otra con azidiol. En el primer experimento las alícuotas de leche se fortificaron a concentraciones equivalentes al Límite Máximo de Residuos (LMR) para los antibióticos betaláctamicos (amoxicilina, ampicilina y penicilina G) y para la oxitetraciclina a 2 LMR debido a los límites de detección de los métodos, para evaluar el efecto del tiempo de refrigeración y la presencia de conservante sobre la sensibilidad de los métodos microbiológicos.

En el segundo experimento, se calcularon los límites de detección a partir de 12 concentraciones de los antibióticos señalados anteriormente, con el objetivo de calcular las pérdidas de actividad antimicrobiana en los distintos tiempos de refrigeración (0, 24, 48 y 72 horas), en muestras de leche sin conservante y con azidiol.

1. EFECTO DE LA REFRIGERACIÓN SOBRE LA SENSIBILIDAD DE LOS MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS EN MUESTRAS DE LECHE SIN CONSERVANTE Y CON AZIDIOL

En los Cuadros 3, 4, y 5 se presentan los resultados de sensibilidad de los métodos microbiológicos BRT AiM[®], Delvotest[®] Accelerator y Eclipse[®] 100 en muestras de leche fortificadas con concentraciones equivalentes al LMR (4 µg/Kg) para la amoxicilina, ampicilina y penicilina G y 2 LMR (200 µg/Kg) para la oxitetraciclina durante los 7 días de refrigeración de las muestras de leche sin conservante y con azidiol.

En el método BRT AiM[®] (Cuadro 3) las muestras de leche fortificadas con 4 µg/Kg de amoxicilina y ampicilina presentaron una sensibilidad del 100% durante toda

la semana de refrigeración. En cambio para la penicilina G y la oxitetraciclina a los 7 días de almacenamiento se produjo una disminución de la sensibilidad (75%). Estos valores mejoraron con la presencia de azidiol en las muestras de leche (100%).

Cuadro 3. Sensibilidad del método BRT AiM[®] para los antibióticos betaláctamicos y la oxitetraciclina

Horas (día)	Amoxicilina (4 µg/Kg)	Ampicilina (4 µg/Kg)	Penicilina G (4 µg/Kg)	Oxitetraciclina (200 µg/Kg)
0 (1)	100/100	100/100	100/100	100/100
12 (2)	100/100	100/100	100/100	100/100
24 (2)	100/100	100/100	100/100	100/100
36 (3)	100/100	100/100	100/100	100/100
48 (3)	100/100	100/100	100/100	100/100
72 (4)	100/100	100/100	100/100	100/100
96 (5)	100/100	100/100	100/100	100/100
168 (7)	100/100	100/100	75/100	75/100

Sensibilidad: positivos/total x 100; sin conservante/con azidiol

Los resultados del método Delvotest[®] Accelerator (Cuadro 4) para la amoxicilina y ampicilina fueron del 100% durante las 168 horas (7 días) de almacenamiento a 4 °C. Por el contrario, para la penicilina G, la sensibilidad se vio afectada por el tiempo de refrigeración con una disminución a los 5 días (96 horas) del 83% que llegó hasta un 67% el séptimo día de refrigeración. Con la oxitetraciclina ya en muestras sin refrigerar (0 horas) este método presentó una sensibilidad del 50% que disminuyó a las 24 horas de conservación (27%). Estos resultados de la oxitetraciclina mejoraron con el azidiol, ya que hasta el cuarto día no se produjo un descenso de la sensibilidad (75%).

Por ultimo, el método Eclipse[®] 100 (Cuadro 5) presentó menores porcentajes de sensibilidad para los antibióticos betalactámicos con la refrigeración de las muestras de leche. Así, para la amoxicilina y la penicilina G a los 4 días la sensibilidad fue del 84% y en la ampicilina, se obtuvo este valor al quinto día de refrigeración. Hay que señalar que con la presencia de azidiol en las muestras de leche la sensibilidad fue máxima (100%). En el estudio de la oxitetraciclina con el método Eclipse[®] 100 la sensibilidad obtenida fue más elevada que en los otros métodos con porcentajes entre el 92-100%.

Cuadro 4. Sensibilidad del método Delvotest® Accelerator para los antibióticos betaláctamicos y la oxitetraciclina

Horas (día)	Amoxicilina (4 µg/Kg)	Ampicilina (4 µg/Kg)	Penicilina G (4 µg/Kg)	Oxitetraciclina (200 µg/Kg)
0 (1)	100/100	100/100	100/100	50/100
12 (2)	100/100	100/100	100/100	50/100
24 (2)	100/100	100/100	100/100	27/100
36 (3)	100/100	100/100	100/100	25/100
48 (3)	100/100	100/100	100/100	25/100
72 (4)	100/100	100/100	100/100	25/75
96 (5)	100/100	100/100	83/100	0/75
168 (7)	100/100	100/100	67/92	0/67

Sensibilidad: positivos/total x 100; sin conservante/con azidiol

Cuadro 5. Sensibilidad del método Eclipse® 100 para los antibióticos betaláctamicos y la oxitetraciclina

Horas (día)	Amoxicilina (4 µg/Kg)	Ampicilina (4 µg/Kg)	Penicilina G (4 µg/Kg)	Oxitetraciclina (200 µg/Kg)
0 (1)	100/100	100/100	100/100	100/100
12 (2)	100/100	100/100	100/100	100/100
24 (2)	100/100	100/100	100/100	100/100
36 (3)	92/100	100/100	100/100	100/100
48 (3)	92/100	100/100	100/100	100/100
72 (4)	84/100	100/100	83/100	100/100
96 (5)	84/100	84/100	83/100	100/100
168 (7)	75/100	75/100	75/84	92/100

Sensibilidad: positivos/total x 100; sin conservante/con azidiol

En cuanto a los estudios realizados por otros autores del efecto de la refrigeración y la presencia de azidiol en las muestras de leche sobre la sensibilidad de los métodos microbiológicos, Borràs y col. (2007) obtuvo en muestras de leche de oveja fortificadas con ampicilina y penicilina G a concentraciones equivalentes al LMR una disminución de la sensibilidad a las 24 horas de refrigeración en los métodos Copan[®] CMT, Delvotest[®] MCS y Eclipse[®] 100.

Esta diferencia de resultados podría explicarse a posibles cambios en los límites de detección (LD) de los métodos por parte de las casas comerciales a raíz de la publicación del RD 1728/2007, en el cual se establece que los métodos empleados tienen que ser capaces de detectar al menos la amoxicilina, ampicilina y oxitetraciclina a niveles del LMR (Anexo IV), y hasta el momento los métodos detectaban la oxitetraciclina a concentraciones muy elevadas. Así, Althaus y col. (2002) calculó para la oxitetraciclina en el método Delvotest[®] un límite de detección de 420 µg/Kg y Montero y col. (2005) 560 µg/Kg para el Eclipse[®] “100ov”. Por otro lado, Molina y col. (2003b) señalaron límites más elevados cuando utilizaron el método BRT[®] AiM (5500 µg/Kg) con muestras de leche de oveja similares a los obtenidos por Frank (1995) en leche de vaca (5000 µg/Kg).

En un estudio más reciente realizado por Roca y col. (2007), sobre validación de los métodos microbiológicos en leche de vaca, los métodos Delvotest[®] Accelerator y Eclipse[®] 100, no fueron capaces de detectar la oxitetraciclina hasta concentraciones de 400 µg/Kg y el BRT AiM[®] a esta concentración (4 veces LMR) sólo presentaba un 20% de sensibilidad.

Por otro lado, hay que destacar que la diferencia de resultados entre métodos puede ser debida a los diferentes LD presentados por los fabricante, ya que para un mismo antibiótico los LD varían entre métodos. Por ejemplo, el LD para la amoxicilina en el método BRT AiM[®] se encuentra entre 3-4 µg/Kg, Delvotest[®] Accelerator entre 2-3 µg/Kg y Eclipse[®] 100 5 µg/Kg.

Por todo ello, con el propósito de profundizar en el estudio del efecto de la presencia de conservante y la refrigeración de las muestras de leche sobre la respuesta de los métodos microbiológicos, se realizó un segundo experimento a partir de muestras refrigeradas sin conservante y con azidiol, a las que se les adicionaron 12 concentraciones de los antibióticos utilizados en el primer experimento. Las concentraciones se seleccionaron según los límites de detección de los métodos, con el objetivo de poder estimar las pérdidas de actividad antimicrobiana.

2. EFECTO DE LA REFRIGERACIÓN SOBRE LA PÉRDIDA DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS ANTIBIÓTICOS EN LA LECHE

2.1. Penicilinas

2.1.1. Amoxicilina

En el Cuadro 6 se presenta el análisis estadístico de los factores de variación (concentración, conservante y tiempo de refrigeración) sobre la respuesta de los métodos BRT AiM[®], Delvotest[®] Accelerator y Eclipse[®] 100 para la amoxicilina. Se observa el efecto significativo de la concentración de amoxicilina, la presencia de conservante y el tiempo de refrigeración ($p < 0,001$) en los tres métodos, aunque en el caso del Eclipse[®] 100 la presencia de azidiol presentó un nivel de significación menor ($p < 0,05$).

Cuadro 6. Efecto de la concentración de amoxicilina, del tiempo de refrigeración y de la presencia de azidiol en las muestras de leche sobre la respuesta de los métodos microbiológicos

Método	Concentración		Tiempo refrigeración		Azidiol	
	Valor χ^2	Valor p	Valor χ^2	Valor p	Valor χ^2	Valor p
BRT [®] AiM	943,441	0,0000	32,303	0,0000	29,416	0,0000
Delvotest [®] Acc.	918,351	0,0000	48,528	0,0000	96,073	0,0000
Eclipse [®] 100	997,372	0,0000	59,749	0,0000	4,533	0,0332

Delvotest Acc.: Delvotest[®] Accelerator

A su vez, en el Cuadro 7 se exponen las ecuaciones calculadas a partir de la aplicación del modelo logístico para la predicción de resultados positivos en el análisis de la amoxicilina mediante los tres métodos microbiológicos empleados junto a los valores de los coeficientes de concordancia (C) que en los tres casos resultaron muy elevados (91,2-95,6%), poniendo de manifiesto el adecuado ajuste alcanzado.

Cuadro 7. Ecuaciones de predicción para los métodos microbiológicos empleados en la detección de amoxicilina en la leche

Método	$L = \beta_0 + \beta_1 C_i + \beta_2 R_j + \beta_3 A_k$	C (%)
BRT [®] AiM	$L = -15,428 + 17,4741[\text{amox}] - 0,0279287R + 1,11479A$	95,6
Delvotest [®] Acc.	$L = -18,5084 + 9,89635[\text{amox}] - 0,0534169R + 1,29457A$	91,2
Eclipse [®] 100	$L = -40,8167 + 14,2246[\text{amox}] - 0,0513718R + 0,884608A$	94,8

Delvotest Acc.: Delvotest[®] Accelerator; L: $\ln(\text{Probabilidad } (+)/1 - \text{Probabilidad } (+))$; [amox]: concentración de amoxicilina; R: tiempo de refrigeración; A: azidiol (sin conservante=0 y con azidiol=1); C: concordancia

A partir de las ecuaciones de predicción obtenidas se representan las curvas dosis-respuesta de los métodos BRT[®] AiM (Figuras 6 y 7), Delvotest[®] Accelerator (Figuras 8 y 9) y Eclipse[®] 100 (Figuras 10 y 11) para la amoxicilina en los diferentes tiempos de refrigeración de las muestras de leche sin conservante y con azidiol.

Como se observa en las figuras, los resultados positivos disminuyeron con el paso de las horas de refrigeración. La respuesta de los métodos en muestras de leche con azidiol y sin refrigerar (0 horas) fueron más elevadas respecto aquellas sin conservante, además con las horas de refrigeración la frecuencia de resultados positivos continuó siendo más elevada con la presencia de azidiol en las muestras.

En las figuras se puede apreciar que los métodos Delvotest[®] Accelerator y Eclipse[®] 100 necesitaron un incremento más elevado de la concentración de amoxicilina para producir respuestas positivas, ya que ambos presentaron pendientes (β_1) menores que el método BRT[®] AiM (Cuadro 7).

Aunque en todos los métodos el tiempo de refrigeración resultó significativo, se observa en las figuras que la distancia de las curvas de los distintos tiempos no es la misma, así en el método Delvotest[®] Accelerator (Figura 8) la distancia de las curvas de los diferentes tiempos son mayores que en los otros métodos (Figuras 6 y 10)

Por ello, al realizar el análisis estadístico de las diferentes horas respecto a las muestras sin refrigerar (Cuadro 8), se observó que en la respuesta de los métodos Delvotest[®] Accelerator y Eclipse[®] 100 aparecieron diferencias significativas a las 48 horas de conservación, en cambio en la respuesta del método BRT[®] AiM hasta las 72 horas no se apreciaron diferencias.

Cuadro 8. Efecto del tiempo de refrigeración sobre la respuesta de los métodos microbiológicos en muestras de leche con amoxicilina

Método	0-24 horas		0-48 horas		0-72 horas	
	Valor χ^2	Valor p	Valor χ^2	Valor p	Valor χ^2	Valor p
BRT [®] AiM	0,000	1,0000	0,000	1,0000	20,628	0,0000
Delvotest [®] Acc.	0,000	1,0000	6,424	0,0113	61,966	0,0000
Eclipse [®] 100	0,000	1,0000	22,127	0,0000	96,071	0,0000

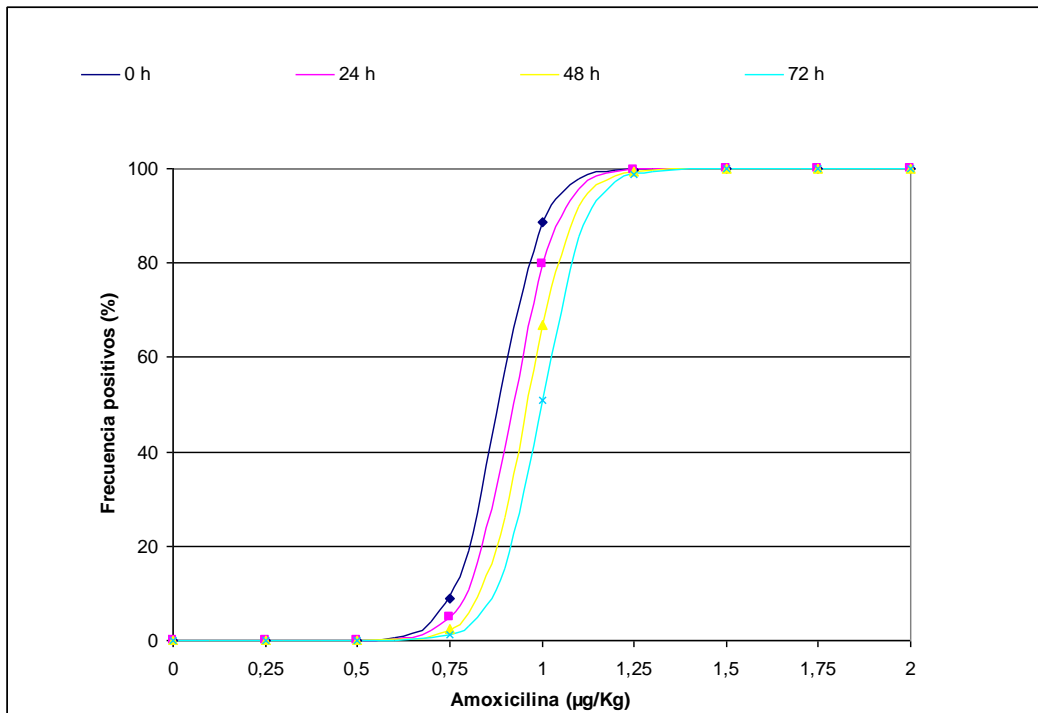


Figura 6. Curvas dosis-respuestas del método BRT AiM[®] en la detección de amoxicilina en muestras de leche sin conservante

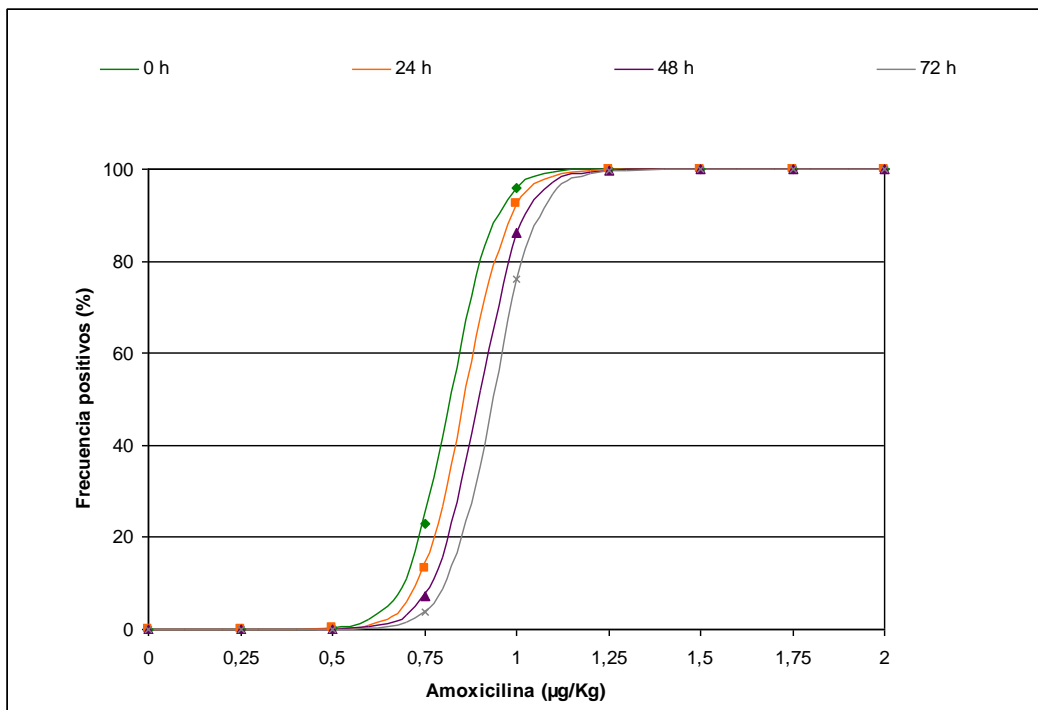


Figura 7. Curvas dosis-respuesta del método BRT[®] AiM en la detección de amoxicilina en muestras de leche con azidol

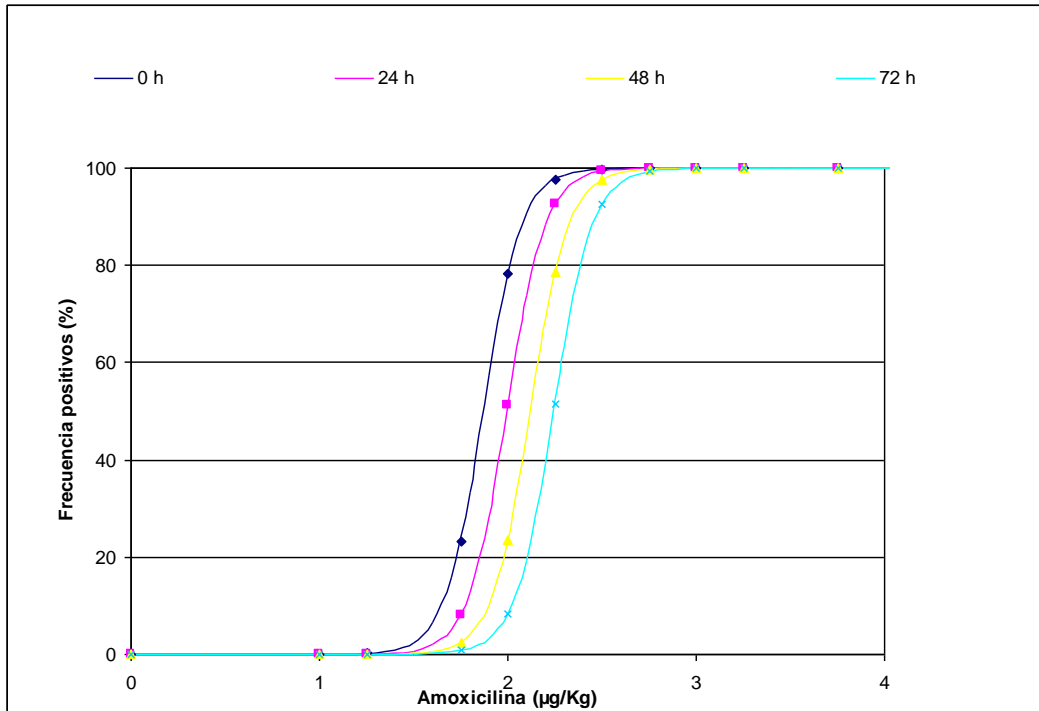


Figura 8. Curvas dosis-respuesta del método Delvotest® Accelerator en la detección de amoxicilina en muestras de leche sin conservante

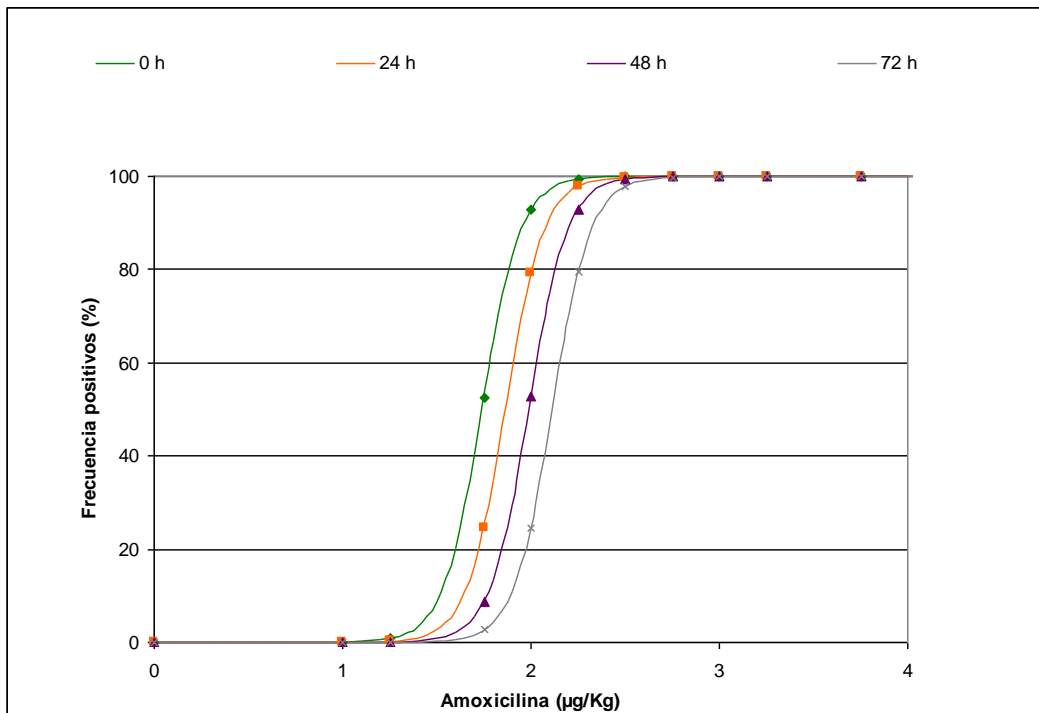


Figura 9. Curvas dosis-respuesta del método Delvotest® Accelerator en la detección de amoxicilina en muestras de leche con azidiol

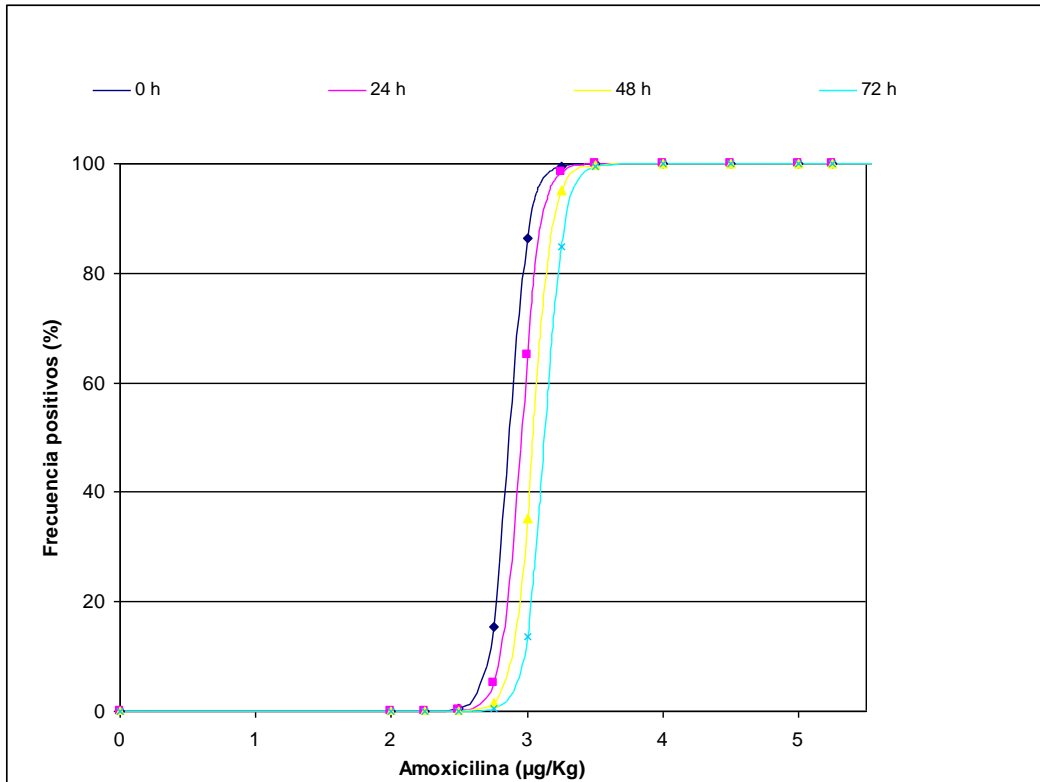


Figura 10. Curvas dosis-respuesta del método Eclipse® 100 en la detección de amoxicilina en muestras de leche sin conservante

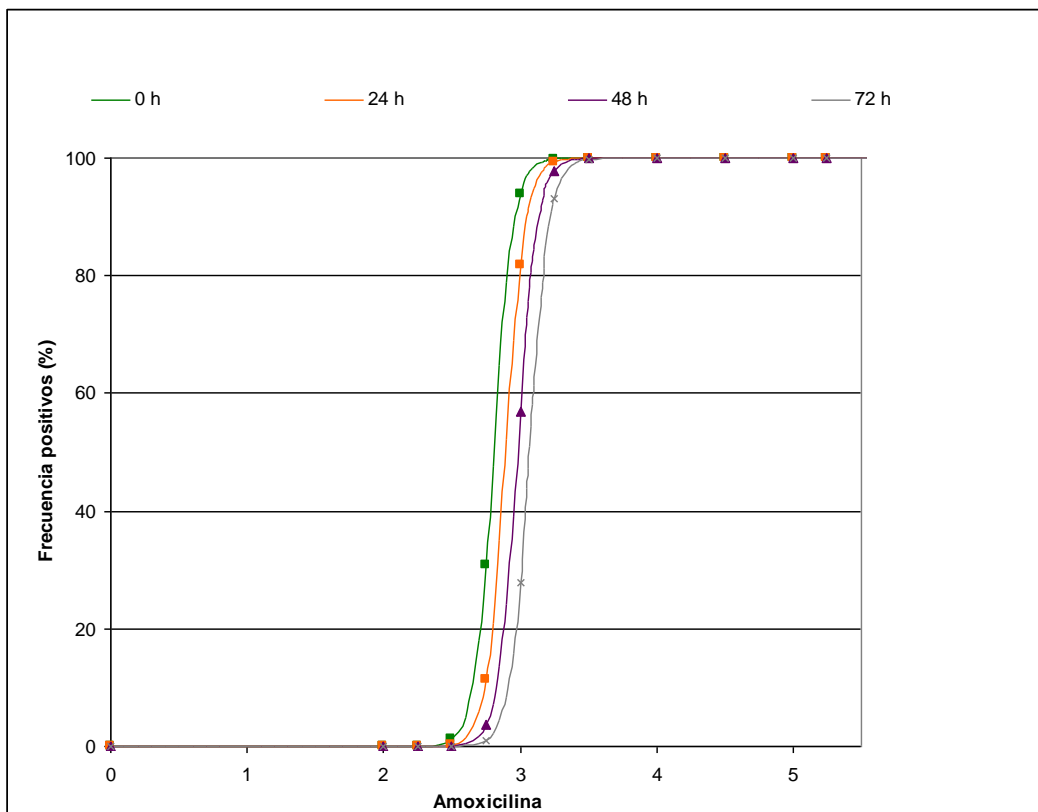


Figura 11. Curvas dosis-respuesta del método Eclipse® 100 en la detección de amoxicilina en muestras de leche con azidiol

Del mismo modo, la presencia de azidiol en las muestras también resultó significativa en los tres métodos pero al realizar el análisis estadístico más detallado de la presencia de azidiol en los distintos tiempos de refrigeración (Cuadro 9), se observó que la presencia de azidiol no fue significativa sobre la respuesta de los métodos BRT[®] AiM y Delvotest[®] Accelerator hasta las 72 horas. En cambio, en el método Eclipse[®] 100 fue a las 48 horas de almacenamiento, indicando que a este tiempo los resultados de las muestras con azidiol son significativamente más elevados con respecto aquellas que no contenían conservante.

Cuadro 9. Efecto de la presencia de azidiol sobre la respuesta de los métodos microbiológicos en muestras de leche con amoxicilina

Método	0-24 horas		0-48 horas		0-72 horas	
	Valor χ^2	Valor p	Valor χ^2	Valor p	Valor χ^2	Valor p
BRT [®] AiM	0,000	1,0000	0,000	1,0000	20,628	0,0000
Delvotest [®] Acc.	0,000	1,0000	6,424	0,0113	21,366	0,0000
Eclipse [®] 100	0,000	1,0000	0,000	1,0000	8,689	0,0032

Teniendo en cuenta que en los laboratorios de control de calidad las muestras de leche pueden permanecer refrigeradas hasta su análisis, se ha considerado conveniente estimar las pérdidas relativas de actividad antimicrobiana (PAA) a partir de la respuesta de los métodos microbiológicos de cribado.

Para poder estimar estas pérdidas, ya que los métodos utilizados presentan una respuesta cualitativa, en primer lugar se calcularon los límites de detección (LD), a partir de las ecuaciones de predicción obtenidas (Cuadro 7) en muestras de leche sin conservante y sin refrigerar. Estos límites de detección corresponden a las concentraciones de antibiótico que deberían hallarse originalmente en las muestras de leche para que produzcan un 95% de resultados positivos según el criterio propuesto por FIL-ISO (2002) para métodos microbiológicos e interpretaciones visuales.

Los límites de detección para la amoxicilina en muestras de leche sin conservante y sin refrigerar fueron para los métodos BRT AiM[®], Delvotest[®] Accelerator y Eclipse[®] 100 de 1,05, 2,16 y 3,08 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, respectivamente. Los límites de detección calculados para los métodos BRT AiM[®] y Eclipse[®] 100 resultaron inferiores a los indicados por los fabricantes para la amoxicilina, 3-4 y 5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, lo que podría ser debido al diferente método de cálculo utilizado que, en este caso, fue a partir de la aplicación del modelo logístico. Para el Delvotest[®] Accelerator el valor obtenido en este estudio (2,16 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) se encuentra dentro del intervalo indicado por el fabricante DSM Food (2-3 $\mu\text{g}/\text{Kg}$).

Los límites de detección calculados para la amoxicilina en el método BRT AiM[®] (1,05 µg/Kg) resultaron similares a los obtenidos por Frank (1995), ya que este autor presentó para este método, en leche de vaca, un rango entre 2 y 3 µg/Kg.

Por el contrario, para el método Delvotest[®], también en leche de vaca, otros autores (Honkanen-Buzalski y Reybroeck, (1997); Shuren y Reichmuth, (1998)) señalan un límite de 6 µg/Kg, concentraciones más elevadas que las calculadas en el presente estudio. Los LD obtenidos en los métodos BRT AiM[®] (1,05 µg/Kg) y Delvotest[®] Accelerator (2,16 µg/Kg) en leche de vaca son inferiores a los calculados por Althaus y col. (2002) en muestras de leche de oveja para el BRT[®] (4 µg/Kg) y Delvotest "SP" (3 µg/Kg).

Por último, con el método Eclipse[®] 100 se calculó un límite de detección de 3,08 µg/Kg para la amoxicilina, inferior al obtenido por Montero y col. (2005) con el Eclipse "100 ov" (7 µg/Kg), versión del test aplicada en la leche de oveja.

Comparando estos LD con los 4 µg/Kg establecidos para la amoxicilina como límite máximo de residuos (LMR) por la legislación europea (2377/90/CEE), resulta evidente que estos métodos presentan una mayor sensibilidad para este antibiótico ya que son capaces de detectarla a concentraciones inferiores al LMR, lo que podría dar lugar a resultados "no conformes". Del mismo modo, Roca y col. (2007), en un estudio sobre validación de los métodos de detección de residuos de antibióticos comercializados en España, obtuvieron en los métodos BRT AiM[®], Delvotest[®] Accelerator y Eclipse[®] 100 para la amoxicilina sensibilidades elevadas al LMR, valores entre el 96,7 y 100%. Por el contrario, en un estudio realizado por Sierra y col. (2009) los límites de detección del BRT AiM[®] (4 µg/Kg), Delvotest[®] MCS (4 µg/Kg) y Eclipse[®] 100 (5 µg/Kg) para la amoxicilina en muestras de leche de cabra resultaron iguales o superiores al LMR.

Posteriormente mediante la Ecuación II, descrita en el apartado de Materiales y Métodos, se estimaron los porcentajes de resultados positivos en los diferentes tiempos de refrigeración cuando se analizan muestras de leche con una concentración equivalente al límite de detección calculado en este estudio. Dichos valores se exponen en el Cuadro 10, tanto para las muestras sin conservante como para aquellas que contenían azidiol. Se aprecia que la frecuencia de resultados positivos disminuyó en la medida que se incrementaron los tiempos de refrigeración, señalando una pérdida de la actividad antimicrobiana en la muestra de leche cuando se retrasa su análisis, tanto para las muestras sin conservante como aquellas con azidiol.

Además, se observa que la presencia de conservante en las muestras de leche, aumentó la frecuencia de resultados positivos con respecto a las muestras sin conservante, ya en las muestras que no fueron refrigeradas (0 horas).

Cuadro 10. Efecto del tiempo de refrigeración y del azidiol sobre el porcentaje de resultados positivos en los métodos microbiológicos para leche con amoxicilina

Horas de refrigeración	0	24	48	72
BRT® AiM				
Sin conservante	95	90	83	71
Azidiol	98	97	94	88
Delvotest® Accelerator				
Sin conservante	95	84	59	28
Azidiol	99	95	84	59
Eclipse® 100				
Sin conservante	95	85	63	33
Azidiol	98	93	80	55

Por último, con el objetivo de calcular las pérdidas relativas de actividad antimicrobiana se aplicó la Ecuación III, también expuesta en el apartado de Materiales y Métodos. Además, al observar que con la presencia de azidiol la frecuencia de resultados positivos aumentaba (Cuadro 10), se calcularon estas pérdidas para muestras sin conservante y para aquellas con azidiol, con el propósito de poder comparar si realmente existían diferentes pérdidas al refrigerar las muestras sin conservante o con azidiol.

Con el fin de visualizar estas pérdidas de actividad antimicrobiana en la amoxicilina a lo largo de 72 horas de almacenamiento se ha elaborado la Figura 12, donde se evidencia que las pérdidas relativas de actividad antimicrobiana fueron más elevadas en las muestras sin conservante, poniendo de manifiesto que el azidiol impide o retrasa la degradación del antibiótico. Así, en los tres métodos las muestras con azidiol refrigeradas 24 horas las pérdidas de actividad para la amoxicilina fueron del 0%, al aumentar el tiempo a 48 horas y 72 horas en el método BRT® AiM estas pérdidas continuaron siendo bajas (1% y 7%, respectivamente).

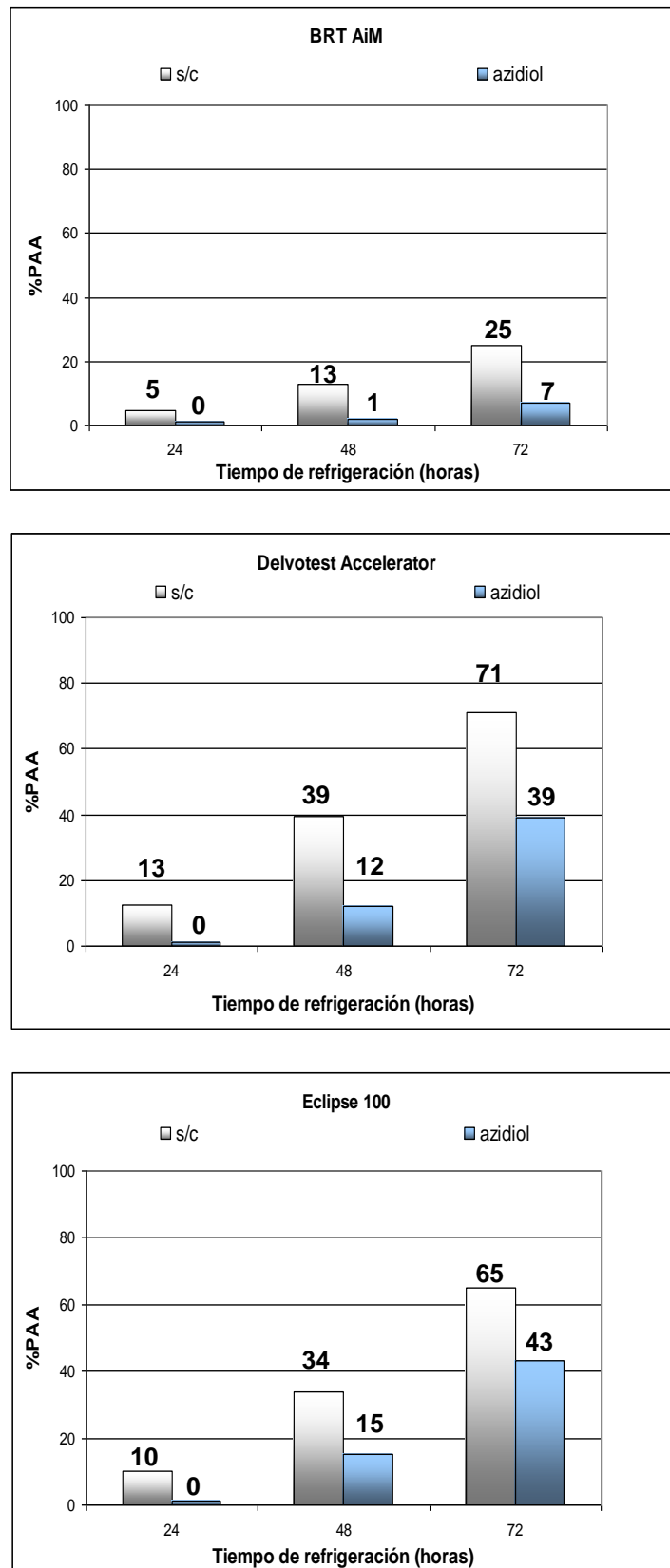


Figura 12. Efecto del tiempo de refrigeración sobre las pérdidas relativas de actividad antimicrobiana (PAA) de amoxicilina leche sin conservante y con azidol

Esto podría ser debido a que la presencia del conservante retrasa el crecimiento microbiano en la leche y por tanto la posible liberación por parte de los microorganismos de enzimas que actúen como factor de degradación de los antibióticos (por ejemplo betalactamasas). Este hecho queda reflejado en un trabajo realizado por Guay y col. (1987) sobre la influencia de las betalactamasas en la presencia de penicilina G.

Se debe destacar que las pérdidas relativas de actividad antimicrobiana para los métodos Delvotest[®] Accelerator y Eclipse[®] 100 (Figura 12) fueron muy similares valores que oscilan entre 71 y 65%, respectivamente en las muestras sin conservante las 72 horas, lo que puede ser debido a que estos métodos basan su respuesta en el cambio de color del indicador, púrpura de bromocresol debido a una reacción ácido-base por lo que la interferencia de la evolución del pH de las muestras de leche durante la refrigeración podría influir en los resultados de los métodos. A su vez la respuesta del método BRT AiM[®] se basa en una reacción oxido-reducción (redox), con el negro brillante como indicador, por lo que su respuesta se vería menos afectada por los cambios de pH, de hecho las pérdidas en este método son menores (25%)

Es importante resaltar que en el caso que los laboratorios de control necesitaran refrigerar las muestras de leche, sería conveniente mantenerlas con azidiol, ya que las pérdidas relativas son menores a las alcanzadas para muestras sin conservante, en especial en el caso de emplear métodos cuya respuesta se basa en reacciones ácido-base.

En cuanto a los estudios sobre el efecto de la refrigeración de la leche encontrados en la bibliografía, han sido realizados mediante técnicas cuantitativas basados en HPLC por lo que los resultados no son muy comparables.

Así, 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. Los resultados obtenidos indicaron una degradación 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 (2008) mediante HPLC alcanzó ya a las 72 horas de almacenamiento a 4 °C una degradación del 24% para la amoxicilina, porcentaje similar al calculado para el método cualitativo BRT[®] AiM (25%).

2.1.2. Ampicilina

Los resultados del análisis estadístico de los factores concentración de antibiótico, presencia de conservante en las muestras de leche y tiempo de refrigeración sobre la respuesta de los métodos microbiológicos BRT[®] AiM, Delvotest[®] Accelerator y Eclipse[®] 100 referentes a la ampicilina se presentan en el Cuadro 11, donde se señala que todos los factores resultaron altamente significativos ($p < 0,001$), a excepción de la presencia de azidiol en el método BRT[®] AiM cuyo nivel de significación resultó menor ($p < 0,01$).

Cuadro 11. Efecto de la concentración de ampicilina, del tiempo de refrigeración y de la presencia de azidiol en las muestras de leche sobre la respuesta de los métodos microbiológicos

Método	Concentración		Tiempo refrigeración		Azidiol	
	Valor χ^2	Valor p	Valor χ^2	Valor p	Valor χ^2	Valor p
BRT [®] AiM	722,366	0,0000	16,106	0,0001	7,880	0,0050
Delvotest [®] Acc.	675,921	0,0000	122,297	0,0000	66,617	0,0000
Eclipse [®] 100	372,201	0,0000	170,261	0,0000	45,328	0,0000

Delvotest Acc.: Delvotest[®] Accelerator

En el Cuadro 12 se recogen las ecuaciones de predicción de los resultados positivos para cada método y las concordancias obtenidas mediante la regresión logística. Las concordancias fueron menos elevadas (70-75,41%) a las obtenidas para los métodos en muestras con amoxicilina, indicando que el ajuste del modelo logístico no resultó tan bueno como en el caso anterior.

Cuadro 12. Ecuaciones de predicción para los métodos microbiológicos empleados en la detección de ampicilina en la leche

Método	$L = \beta_0 + \beta_1 C_i + \beta_2 R_j + \beta_3 A_k$	C (%)
BRT [®] AiM	$L = -5,44943 + 6,30913[\text{ampi}] - 0,0238555R + 0,888614A$	73,25
Delvotest [®] Acc.	$L = -11,1821 + 4,39089[\text{ampi}] - 0,0631746R + 2,4097A$	70,00
Eclipse [®] 100	$L = -5,04786 + 2,41831[\text{ampi}] - 0,0570115R + 1,51269A$	75,41

Delvotest Acc.: Delvotest[®] Accelerator; L: $\ln(\text{Probabilidad} (+) / 1 - \text{Probabilidad} (+))$; [ampi]: concentración de ampicilina; R: tiempo de refrigeración; A: azidiol (sin conservante=0 y con azidiol=1); C: concordancia

A partir de las ecuaciones obtenidas mediante el modelo logístico (Cuadro 12) se representan las curvas dosis- respuesta para cada uno de los métodos, tanto para muestras sin conservante como para aquellas que contenían azidiol (BRT[®] AiM: Figuras 12 y 13; Delvotest[®] Accelerator: Figuras 14 y 15 y Eclipse[®] 100: Figuras 16 y 17). Se observa que en todas las figuras los resultados positivos descendieron con el

tiempo de refrigeración y que los resultados positivos resultaron más elevados a lo largo del tiempo en las muestras de leche que contenían azidiol.

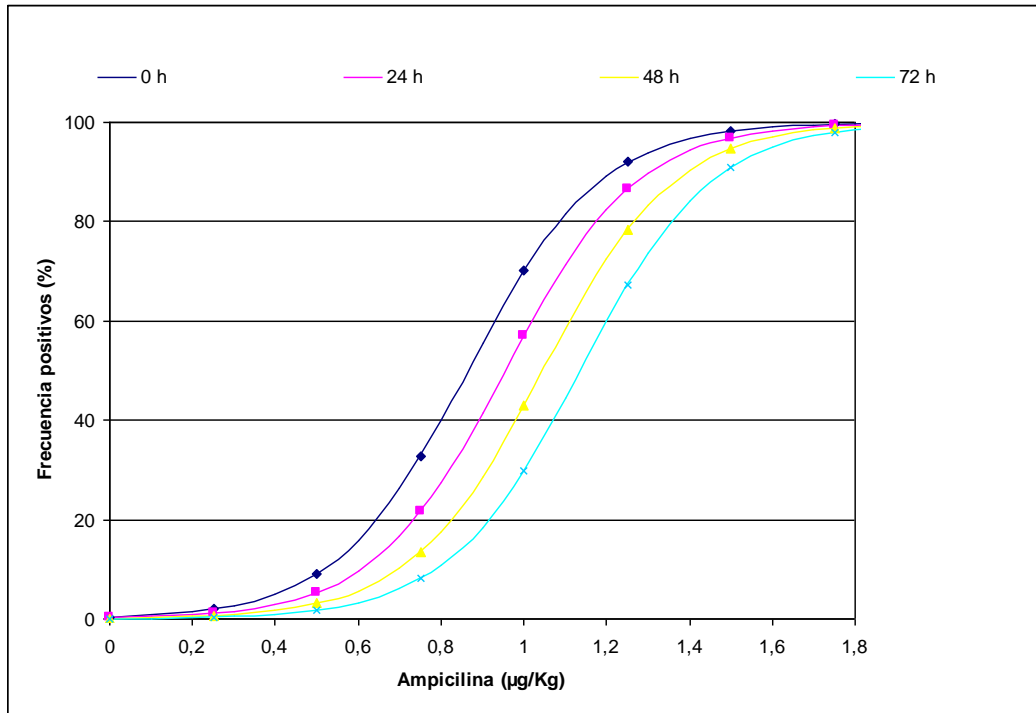


Figura 13. Curva dosis-respuesta del método BRT AiM[®] en la detección de ampicilina en muestras de leche sin conservante

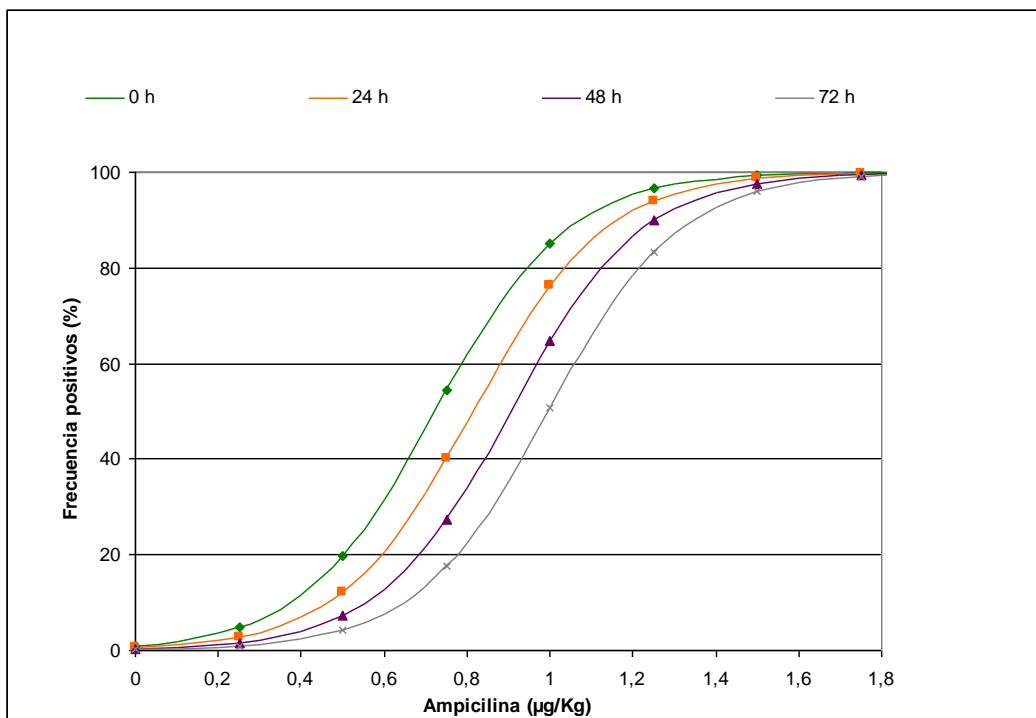


Figura 14. Curva dosis-respuesta del método BRT AiM[®] en la detección de ampicilina en muestras de leche con azidiol

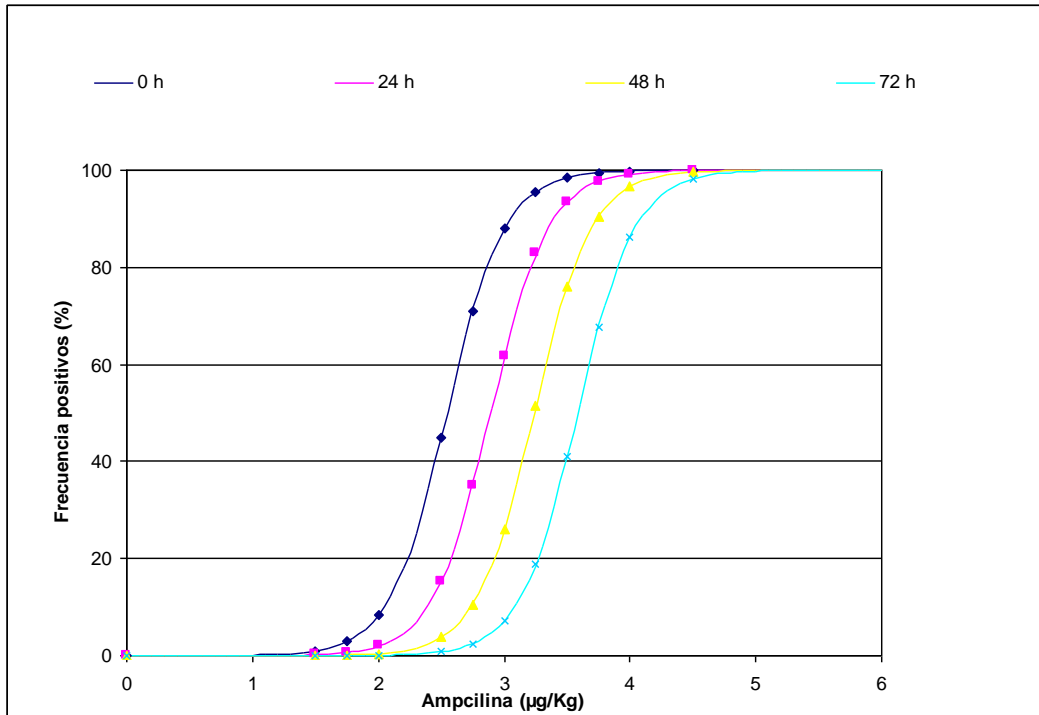


Figura 15. Curva dosis-respuesta del método Delvotest® Accelerator en la detección de ampicilina en muestras de leche sin conservante

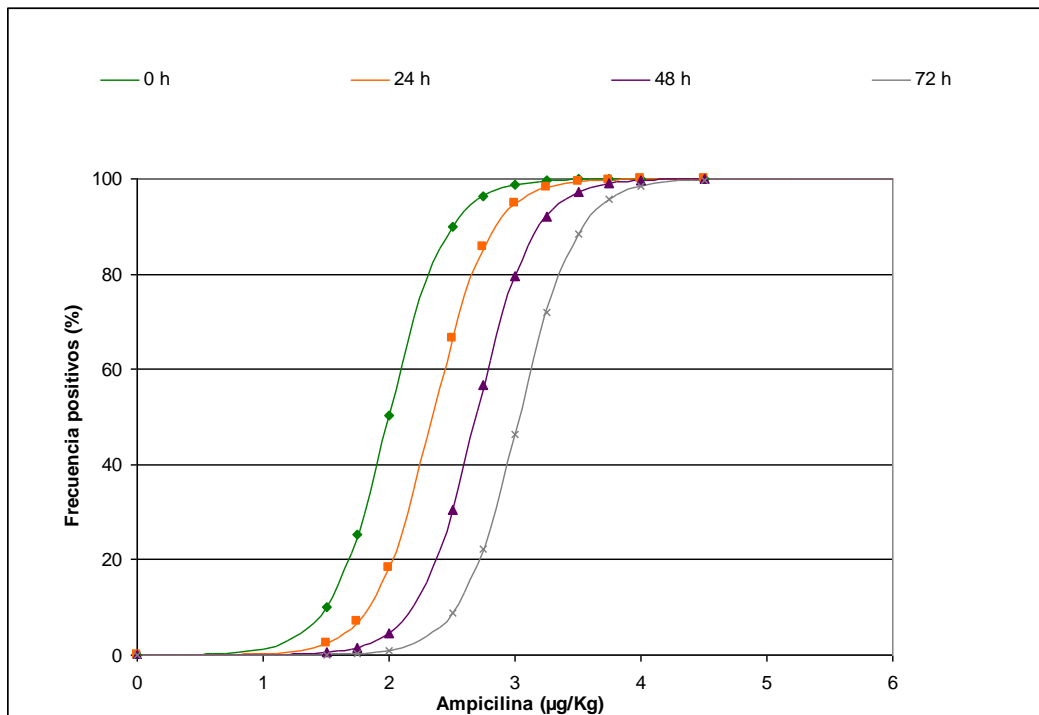


Figura 16. Curva dosis-respuesta del método Delvotest® Accelerator en la detección de ampicilina en muestras de leche con azidol

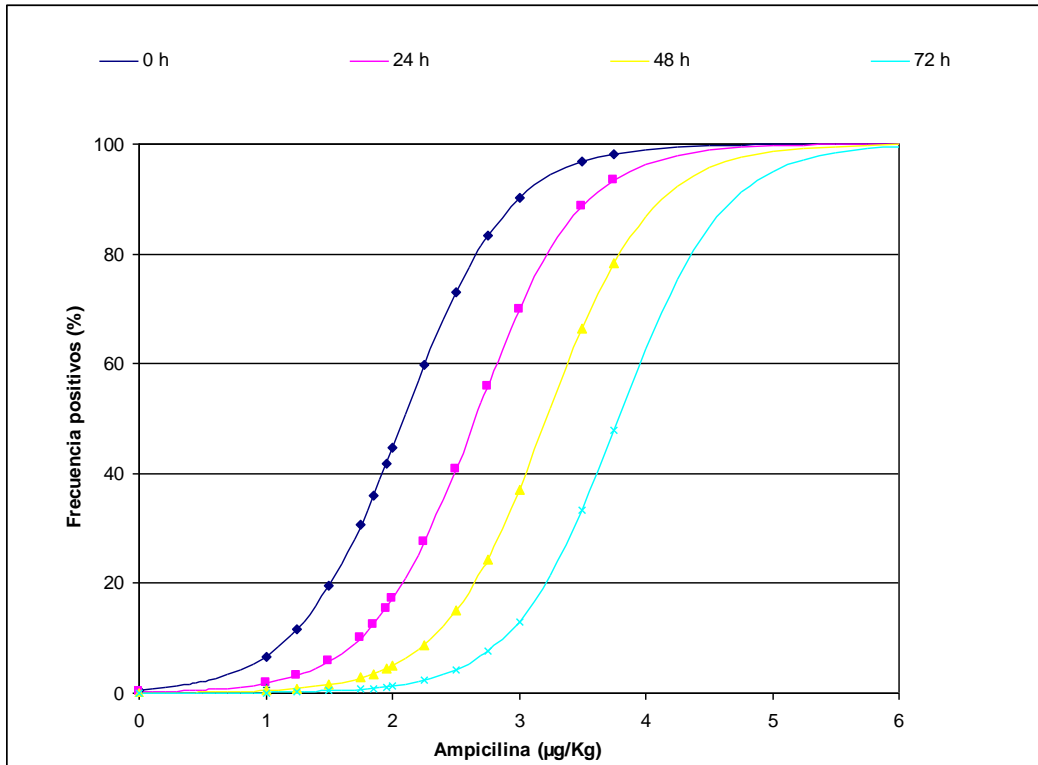


Figura 17. Curva dosis-respuesta del método Eclipse® 100 en la detección de ampicilina en muestras de leche sin conservante

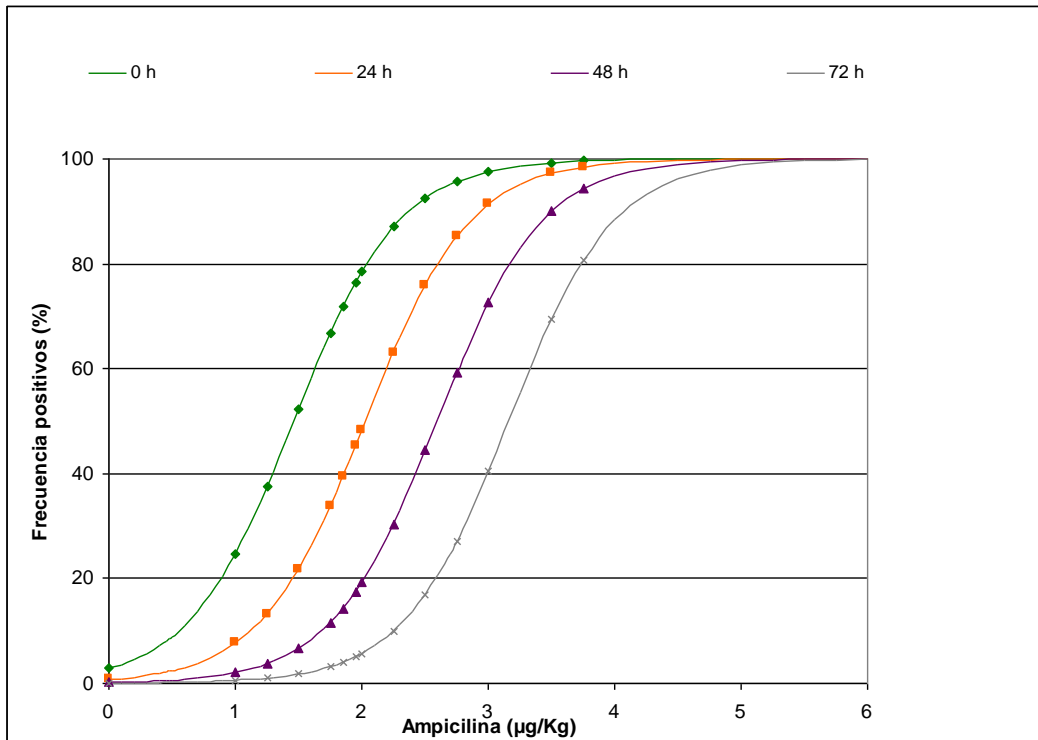


Figura 18. Curva dosis-respuesta del método Eclipse® 100 en la detección de ampicilina en muestras de leche con azidol

En las figuras correspondientes al método del BRT[®] AiM (Figuras 13 y 14) se puede apreciar el rápido cambio en la respuesta ante pequeñas concentraciones de ampicilina, ya que su ecuación presentó una pendiente (β_1) más elevada (Cuadro 12), además en este método la presencia de azidiol tuvo un menor efecto por lo que las diferencias entre los resultados positivos obtenidos en las muestras sin conservante y muestras con azidiol fueron menores que los encontrados en los métodos Delvotest[®] Accelerator (Figuras 15 y 16) y Eclipse[®] 100 (Figuras 17 y 18).

En cuanto al tiempo de refrigeración de las muestras de leche en los métodos Delvotest[®] Accelerator y Eclipse[®] 100 los resultados positivos disminuyeron de forma más rápida con el paso de las horas de frío, con respecto al BRT[®] AiM. Por ello, se observa en las gráficas que la separación de las curvas entre las diferentes horas es menor en este último método.

Al profundizar en el análisis estadístico de los distintos tiempos de refrigeración se aprecia (Cuadro 13) que en el método BRT[®] AiM hasta las 48 horas no se presentaron diferencias entre los resultados, mientras que en los otros dos métodos a las 24 horas ya se observaron diferencias significativas ($p < 0,001$) respecto a las muestras de leche sin refrigerar.

Cuadro 13. Efecto del tiempo de refrigeración sobre la respuesta de los métodos microbiológicos en muestras de leche con ampicilina

Método	0-24 horas		0-48 horas		0-72 horas	
	Valor χ^2	Valor p	Valor χ^2	Valor p	Valor χ^2	Valor p
BRT [®] AiM	3,409	0,0648	14,867	0,0000	12,825	0,0003
Delvotest [®] Acc.	34,572	0,0000	57,540	0,0000	93,145	0,0000
Eclipse [®] 100	18,088	0,0000	80,565	0,0000	131,849	0,0000

A su vez, en el Cuadro 14 se presentan los resultados del análisis estadístico del efecto del azidiol en las distintas horas para conocer en que momento la presencia de conservante resultó significativa y dado que el coeficiente β_3 presentó un signo positivo (Cuadro 12), la frecuencia de resultados positivos fue superior en las muestras con azidiol frente a las sin conservante. Así, sería recomendable si la refrigeración va a resultar superior a 24 horas emplear azidiol para la conservación de las muestras.

Cuadro 14. Efecto de la presencia de azidiol sobre la respuesta de los métodos microbiológicos en muestras de leche con ampicilina

Método	0-24 horas		0-48 horas		0-72 horas	
	Valor χ^2	Valor p	Valor χ^2	Valor p	Valor χ^2	Valor p
BRT [®] AiM	1,732	0,1881	5,286	0,0215	19,556	0,0000
Delvotest [®] Acc.	12,485	0,0004	13,561	0,0002	24,318	0,0000
Eclipse [®] 100	2,439	0,1183	66,535	0,0000	62,503	0,0000

Con el fin de establecer desde un punto de vista práctico los protocolos de trabajo en los laboratorios de control, se han estimado los porcentajes de pérdidas relativas de actividad antimicrobiana (PAA) al refrigerar las muestras de leche 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, mediante las ecuaciones de predicción presentadas en el Cuadro 12

En los métodos Delvotest[®] Accelerator (3,22 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) y Eclipse[®] 100 (3,80 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) los límites de detección calculados en este estudio para la ampicilina fueron superiores a los obtenidos en el BRT AiM[®] (1,33 $\mu\text{g}/\text{Kg}$). Pero en todos los casos estos valores fueron menores a los indicados por los fabricantes 5, 4 y 4 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, respectivamente. Esta diferencia de valores podría ser debida a la diferente metodología utilizada en este estudio, ya que se utilizó un método estadístico basado en la regresión logística.

Cuando se comparan los valores de los límites de detección calculados para la ampicilina con el LMR establecidos por la UE (4 $\mu\text{g}/\text{Kg}$), se observa que los métodos Delvotest[®] Accelerator (3,22 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) y Eclipse[®] 100 (3,80 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) detectaron la ampicilina a valores más próximos a los LMR que el método BRT AiM[®] (1,33 $\mu\text{g}/\text{Kg}$). También Sierra y col. (2009) obtuvieron para el método Delvotest[®] MCS límites de detección inferiores (3 $\mu\text{g}/\text{Kg}$), en cambio para los métodos BRT AiM[®] y Eclipse[®] 100 valores de 4 y 5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, respectivamente.

Por otro lado, Roca y col. (2007) en un estudio sobre validación de los métodos de detección de residuos de antibióticos comercializados en España, en el caso de la ampicilina las sensibilidades fueron del 100% al LMR para los métodos BRT AiM[®] y Delvotest[®] Accelerator y de un 67% para el Eclipse[®] 100.

A partir del límite de detección obtenido para la ampicilina en los distintos métodos y mediante la Ecuación II, propuesta en Materiales y Métodos, se calculó la frecuencia de resultados positivos en las distintas horas de refrigeración en leche sin conservante y con azidiol (Cuadro 15).

En dicho Cuadro se aprecia que los resultados positivos disminuyeron con el tiempo de refrigeración y que los resultados positivos en muestras con azidol resultaron en todo momento superiores a las que no contenían conservante, incluso en muestras sin refrigerar.

Cuadro 15. Efecto del tiempo de refrigeración y del azidol sobre el porcentaje de resultados positivos en los métodos microbiológicos para leche con ampicilina

Horas de refrigeración	0	24	48	72
BRT[®] AiM				
Sin conservante	95	91	86	77
Azidol	98	96	94	89
Delvotest[®] Accelerator				
Sin conservante	95	81	48	17
Azidol	100	98	91	69
Eclipse[®] 100				
Sin conservante	95	83	55	24
Azidol	99	96	87	38

Una vez obtenida la frecuencia de resultados positivos en los distintos tiempos se aplicó la Ecuación III de Materiales y Métodos para el cálculo de las pérdidas de actividad antimicrobiana (PAA), en el caso concreto de la ampicilina, tanto para muestras sin conservante como con aquellas con azidol, con el objetivo de conocer si la presencia de azidol puede disminuir las pérdidas de actividad.

Las pérdidas obtenidas en los tres métodos se representan en la Figura 19, en primer lugar se aprecia que en todos los métodos las pérdidas de actividad antimicrobiana fueron más elevadas en las muestras sin conservante. Así, en los tres métodos las muestras con azidol refrigeradas hasta 48 horas, las pérdidas de actividad para la amoxicilina fueron muy bajos valores entre el 0 y el 4%, al aumentar el tiempo a 72 horas en el método BRT[®] AiM las pérdidas en la leche con azidol siguen siendo muy despreciables (6%).

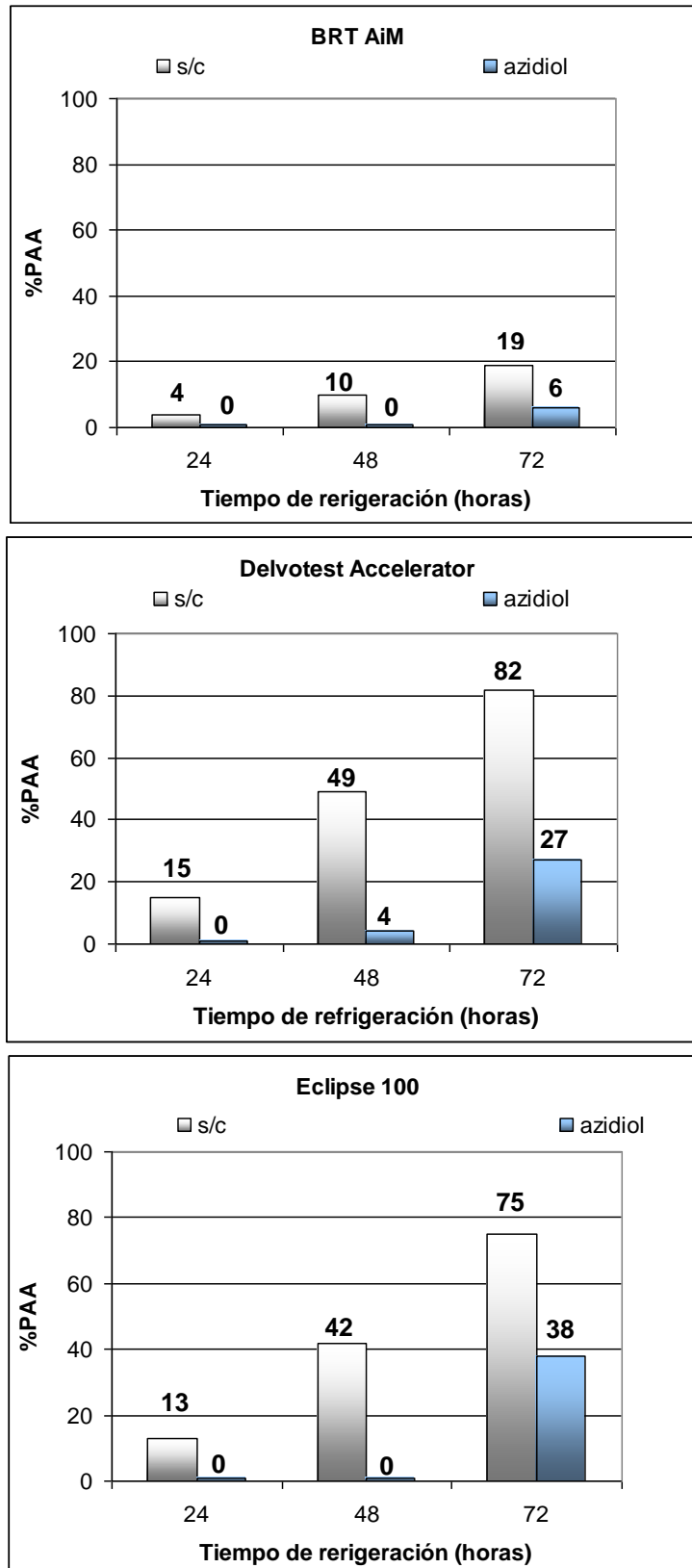


Figura 19. Efecto del tiempo de refrigeración sobre las pérdidas relativas de actividad antimicrobiana (PAA) de ampicilina leche sin conservante y con azidol

En segundo lugar se observa que las pérdidas a las 72 horas fueron mayores en los métodos Delvotest[®] Accelerator y Eclipse[®] 100, que como ya se ha comentado anteriormente en el caso de la amoxicilina, esto puede ser debido al propio fundamento de estos métodos.

En resumen, se puede establecer que cuando en los laboratorios de análisis se deban refrigerar las muestras de leche para su posterior análisis mediante métodos microbiológicos, resultaría conveniente refrigerar las muestras con azidol.

La comparación de los resultados obtenidos con los presentados por otros autores no se puede realizar, ya que en la revisión bibliográfica no se encontraron trabajos sobre las pérdidas de actividad antimicrobiana en la ampicilina mediante métodos microbiológicos. Los estudios encontrados sobre el efecto del almacenamiento a 4 °C de la ampicilina en leche evalúan las pérdidas mediante métodos cuantitativos. Así Wiese y Martín (1989b) no obtuvieron pérdidas significativas en muestras con 20 µg/kg de ampicilina y almacenadas a 4 y -70 °C después de los 6 días de almacenamiento.

Tampoco Schenk y col. (2000) obtuvieron ninguna pérdida significativa en el caso de la ampicilina durante 6 días de conservación en frío mediante una técnica LC-FL .

2.1.3. Penicilina G

El análisis estadístico del efecto de la concentración de penicilina G, el tiempo de refrigeración y la presencia de conservante en la leche se presenta en el Cuadro 16, donde se evidencia el efecto altamente significativo ($p < 0,001$) de estos factores de variación, pero como en la ampicilina el método BRT AiM[®] presentó un menor nivel de significación del factor conservante ($p < 0,05$).

Del mismo modo que en los casos anteriores, en el Cuadro 17 se exponen las ecuaciones calculadas mediante el modelo logístico y los valores del porcentaje de concordancia para cada uno de los métodos estudiados. Para el método BRT AiM[®] la concordancia fue de un 94,32%, en cambio para Delvotest[®] Accelerator y Eclipse[®] 100 la concordancia fue menor con valores del 81,72 y 85,22%, respectivamente.

Cuadro 16. Efecto de la concentración de penicilina G, del tiempo de refrigeración y de la presencia de azidiol en las muestras de leche sobre la respuesta de los métodos microbiológicos

Método	Concentración		Tiempo refrigeración		Azidiol	
	Valor χ^2	Valor p	Valor χ^2	Valor p	Valor χ^2	Valor p
BRT® AiM	877,487	0,0000	90,490	0,0000	4,962	0,0259
Delvotest® Acc.	785,906	0,0000	266,339	0,0000	43,466	0,0000
Eclipse® 100	555,045	0,0000	144,451	0,0000	30,455	0,0000

Delvotest Acc.: Delvotest® Accelerator

Cuadro 17. . Ecuaciones de predicción para los métodos microbiológicos empleados en la detección de penicilina G en la leche

Método	$L = \beta_0 + \beta_1 C_i + \beta_2 R_j + \beta_3 A_k$	C (%)
BRT® AiM	$L = -9,89982 + 16,2848[\text{peni}] - 0,0931993R + 1,00947A$	94,32
Delvotest® Acc.	$L = -7,63808 + 8,54364[\text{peni}] - 0,143823R + 2,5494A$	81,72
Eclipse® 100	$L = -5,35924 + 3,48742[\text{peni}] - 0,0584368R + 1,36833A$	85,22

Delvotest Acc.: Delvotest® Accelerator; L: ln (Probabilidad (+)/1-Probabilidad (+)); [peni]: concentración de penicilina G; R: tiempo de refrigeración; A: azidiol (sin conservante=0 y con azidiol=1); C: concordancia

Las curvas dosis-respuesta obtenidas mediante las ecuaciones calculadas con el modelo logístico para el método BRT AiM® se representan en las Figuras 20 y 21, para el Delvotest® Accelerator en las Figuras 22 y 23 y Eclipse® 100 en las Figuras 24 y 25. En estas figuras se observa que se produjo un descenso gradual de los resultados positivos para las muestras sin conservante y aquellas con azidiol hasta las 72 horas de almacenamiento a 4 °C, pero como en los antibióticos anteriores, en las muestras con conservante los porcentajes positivos fueron más elevados.

Los cambios en la respuesta del BRT AiM® (Figuras 20 y 21) se produjeron a pequeñas concentraciones de penicilina G, ya que como se aprecia en el Cuadro 13 la pendiente en este método fue más elevada (Cuadro 17). En cambio, para los otros métodos se necesitaron incrementos mayores en la concentración de este antibiótico para producir respuestas positivas.

Con las horas de refrigeración los métodos presentaron una menor porcentaje de resultados positivos en muestras de leche con penicilina G que para la amoxicilina y la ampicilina. Sobre todo es el Delvotest® Accelerator el que presentó una mayor disminución de resultados positivos que mejoró considerablemente en las muestras con azidiol si se compara con los otros métodos.

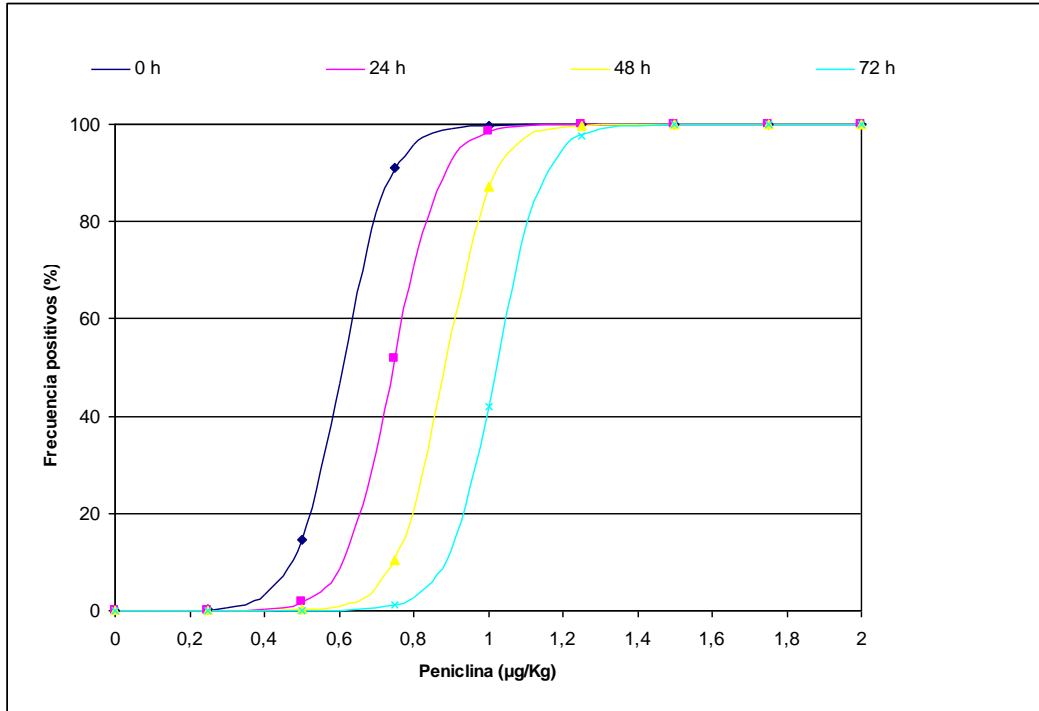


Figura 20. Curvas dosis-respuesta del método BRT AiM® en la detección de penicilina G en muestras de leche sin conservante

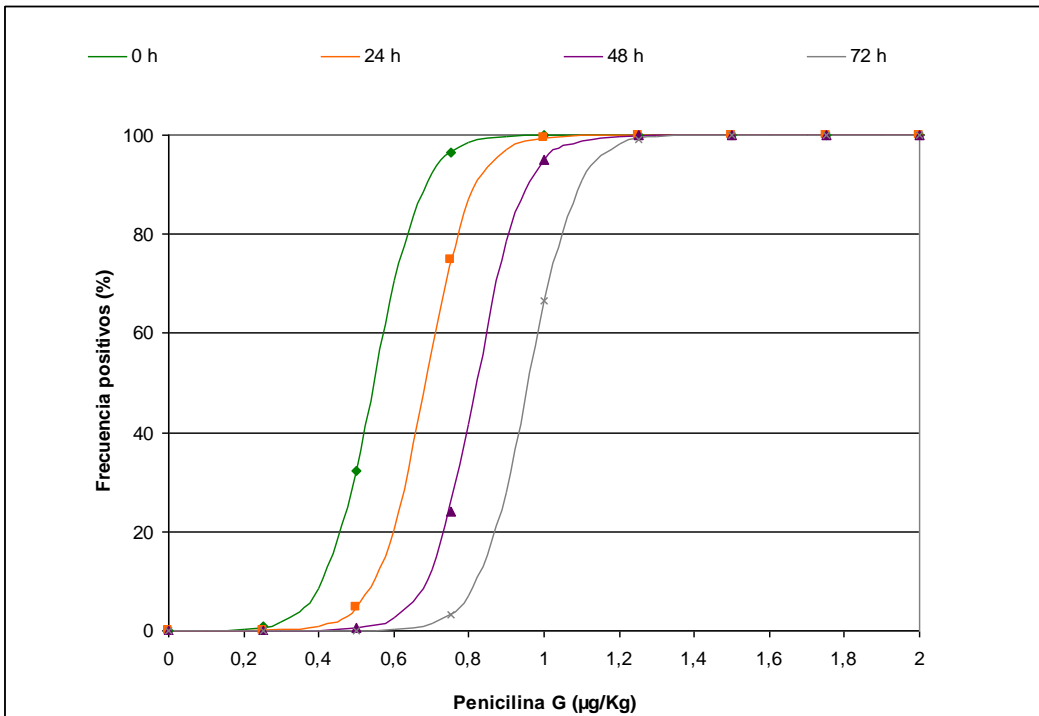


Figura 21. Curvas dosis-respuesta del método BRT AiM® en la detección de penicilina G en muestras de leche con azidiol

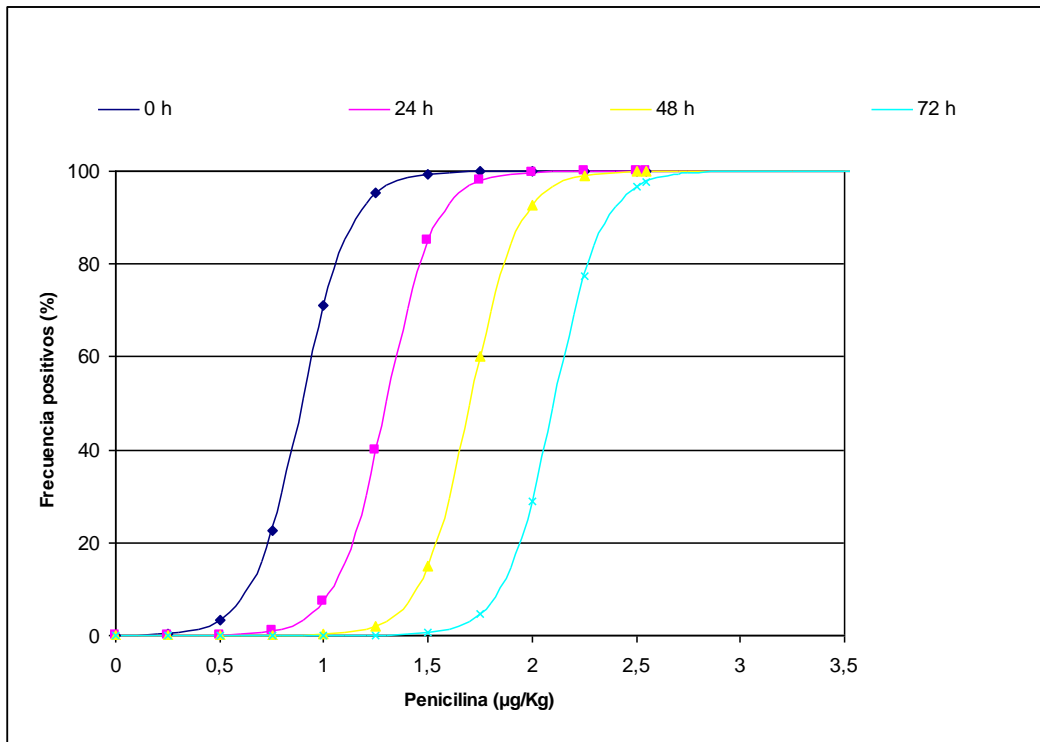


Figura 22. Curvas dosis-respuesta del método Delvotest® Accelerator en la detección de penicilina G en muestras de leche sin conservante

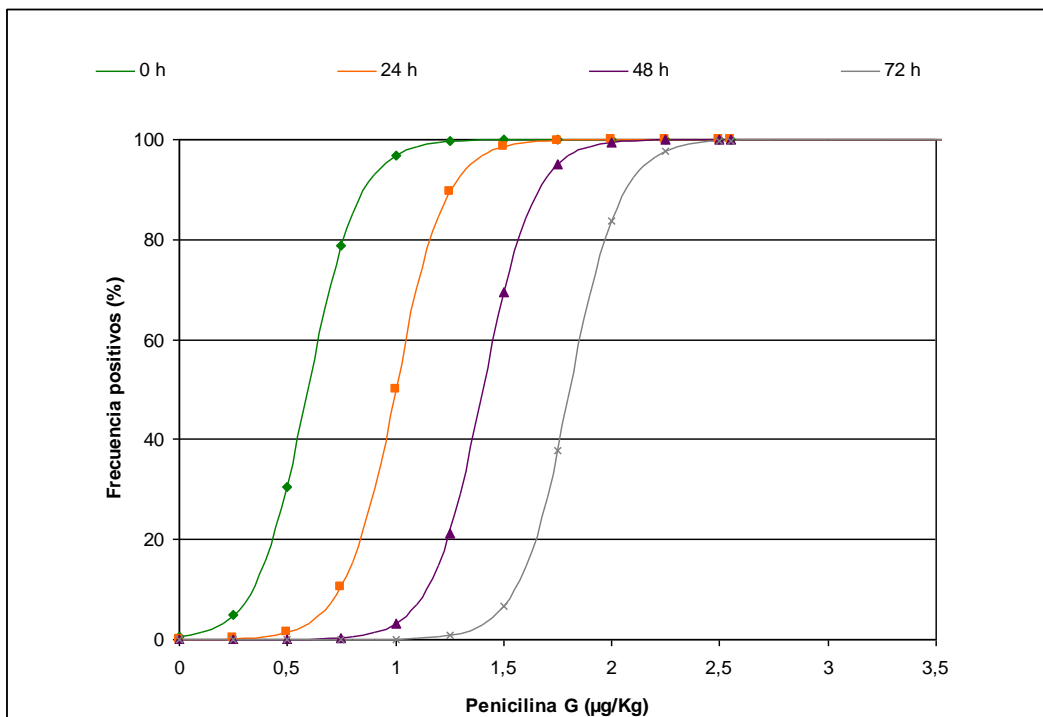


Figura 23. Curvas dosis-respuesta del método Delvotest® Accelerator en la detección de penicilina G en muestras de leche con azidiol

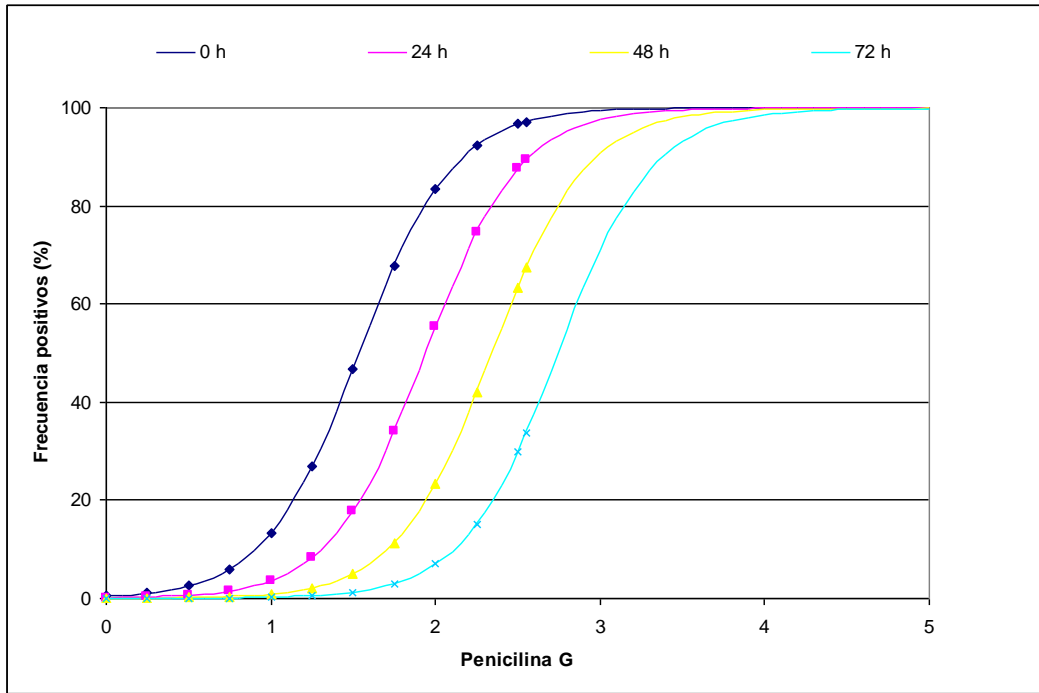


Figura 24. Curvas dosis-respuesta del método Eclipse® 100 en la detección de penicilina G en muestras de leche sin conservante

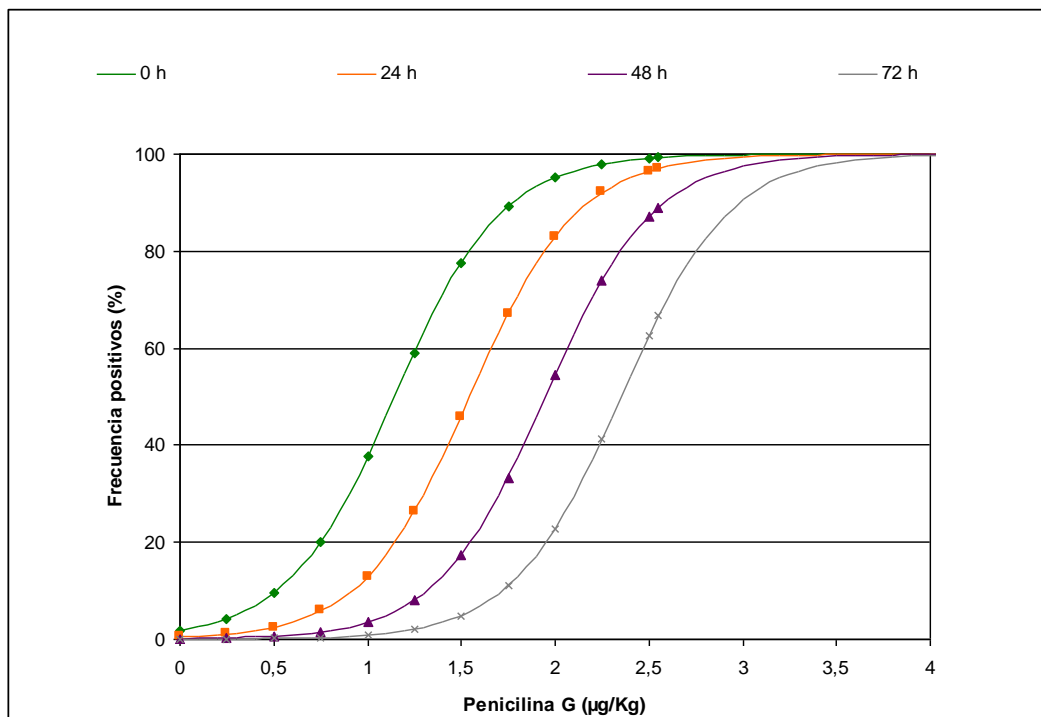


Figura 25. Curvas dosis-respuesta del método Eclipse® 100 en la detección de penicilina G en muestras de leche con azidiol

Cuando se realiza el análisis no de un modo global sino teniendo en cuenta los diferentes intervalos de tiempo de refrigeración sobre la respuesta de los métodos (Cuadro 18), se aprecia que todos los métodos a las 48 horas de conservación presentaron diferente significación frente a las muestras sin refrigerar ($p < 0,001$), por eso sería aconsejable que las muestras se analizaran dentro de las primeras 48 horas, para evitar en el caso de que los residuos fueran de penicilina G pérdidas importantes.

Cuadro 18. Efecto del tiempo de refrigeración sobre la respuesta de los métodos microbiológicos en muestras de leche con penicilina G

Método	0-24 horas		0-48 horas		0-72 horas	
	Valor χ^2	Valor p	Valor χ^2	Valor p	Valor χ^2	Valor p
BRT [®] AiM	0,000	1,0000	130,479	0,0000	63,479	0,0000
Delvotest [®] Acc.	2,957	0,0855	53,357	0,0000	211,073	0,0000
Eclipse [®] 100	3,947	0,0469	69,043	0,0000	116,056	0,0000

Por otro lado, en el análisis del efecto del azidiol en las diferentes horas de refrigeración (Cuadro 19), se pone de manifiesto que el método BRT AiM[®] con muestras refrigeradas y con azidiol hasta las 48 horas no presentó resultados significativamente diferentes con respecto a los obtenidos con las muestras sin conservante. En cambio, el Delvotest[®] Accelerator y Eclipse[®] 100 ya en el primer día (24 horas) los resultados obtenidos con las muestras sin conservante y las muestras con azidiol fueron significativamente diferentes ($p < 0,05$), por lo que en estos métodos para realizar el análisis de residuos de antibióticos sería aconsejable conservar las muestras con azidiol hasta su análisis.

Cuadro 19. Efecto de la presencia de azidiol sobre la respuesta de los métodos microbiológicos en muestras de leche con penicilina G

Método	0-24 horas		0-48 horas		0-72 horas	
	Valor χ^2	Valor p	Valor χ^2	Valor p	Valor χ^2	Valor p
BRT [®] AiM	0,000	1,0000	209,401	0,0000	10,195	0,0014
Delvotest [®] Acc.	2,957	0,0855	13,522	0,0002	13,513	0,0002
Eclipse [®] 100	5,651	0,0174	21,648	0,0000	36,056	0,0000

De la misma manera que se procedió en el estudio de los otros antibióticos betalactámicos, se han estimado las pérdidas relativas de actividad antimicrobiana (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 obtuvieron los límites de detección de los diferentes métodos en muestras sin conservante y que no habían sido refrigeradas (BRT AiM[®]: 0,78 µg/Kg; Delvotest[®] Accelerator: 1,48 µg/Kg y Eclipse[®] 100: 2,38 µg/Kg), estos límites de detección han resultado inferiores a los establecidos por los fabricantes para los métodos BRT AiM[®] y Eclipse[®] 100 (2-3 µg/Kg y 4 µg/Kg, respectivamente). En el caso del Delvotest[®] 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 el BRT AiM[®] (0,78 µg/Kg) es inferior al obtenido por Althaus y col. (2002) cuando utiliza este mismo método con leche de oveja y lecturas fotométricas (2 µg/Kg), también son inferiores a los 1,5 µg/Kg (Heeschen y Blüthgen, 1995), 1-2 µg/Kg (Frank, 1995) y 2-3 µg/Kg (Zaadhof y col. 1997) para diferentes versiones de BRT con muestras de leche de vaca.

En el Delvotest[®] Accelerator el límite de detección calculado (1,48 µg/kg) es igual al calculado por Althaus y col. (2002) en muestras de leche de oveja (1,4 µg/Kg) mediante el Delvotest "SP".

Por último, el límite del Eclipse[®] 100 (2,38 µg/Kg) es inferior al calculado por Montero y col. (2005) al utilizar otra versión del método Eclipse[®] "100 ov" en leche de oveja (5 µg/Kg).

Cuando se efectúa la comparación de los límites de detección obtenidos en este estudio con los LMR, se observa que al igual que en los otros betaláctamicos los límites calculados fueron inferiores a los 4 µg/Kg establecidos por la UE. También Sierra y col. (2009) calculó límites de detección inferiores al LMR para los métodos BRT AiM[®] (2 µg/Kg), Delvotest[®] MCS (2 µg/Kg), y Eclipse[®] 100 (3 µg/Kg).

Por otro lado, en un informe realizado por Roca y col. (2007) sobre validación de métodos de detección de residuos de antibióticos, las sensibilidades para los métodos BRT AiM[®] y Delvotest[®] Accelerator fue del 100% a una concentración de 2 µg/Kg (0,5LMR), sin embargo para el método Eclipse[®] 100, a esta misma concentración, la sensibilidad resultó de un 74%.

Después de obtener los límites de detección para la penicilina G se calcularon las frecuencias de resultados positivos en muestras de leche sin conservante y con azidiol en las distintas horas de refrigeración, los resultados obtenidos se presentan en el Cuadro 20.

En dicho Cuadro se observa que en todos los métodos los resultados positivos fueron menores a medida que transcurren las horas de conservación y que estos resultaron mayores ya en las muestras sin refrigerar, cuando estaba presente el

azidiol, en especial en el método Delvotest® Accelerator donde en las muestras sin conservante se obtuvo un 95% de resultados positivos mientras que en las contienen azidiol el porcentaje se elevó a un 100% de resultados positivos.

Cuadro 20. Efecto del tiempo de refrigeración y del azidiol sobre el porcentaje de resultados positivos en los métodos microbiológicos para leche con penicilina G

Horas de refrigeración	0	24	48	72
BRT® AiM				
Sin conservante	95	64	16	2
Azidiol	98	83	34	5
Delvotest® Accelerator				
Sin conservante	95	36	2	0
Azidiol	100	88	18	1
Eclipse® 100				
Sin conservante	95	82	53	22
Azidiol	99	95	82	53

La aplicación de la Ecuación III (Materiales y Métodos) para cada tipo de muestras (sin conservante y azidiol) en los diferentes tiempos de refrigeración permitió calcular porcentajes de pérdidas de actividad antimicrobiana (PAA) que se representan en la Figura 26. En el método Delvotest® Accelerator a las 48 horas de conservación las pérdidas de actividad antimicrobiana para la penicilina G fueron muy elevadas (81%) y las 72 horas estas pérdidas tanto en la leche sin conservante como con azidiol fueron elevadas (100 y 99%, respectivamente). Hay que destacar que a las 72 horas las pérdidas en el método BRT AiM® en las muestras de leche con azidiol fueron del 7%, este valor fue muy diferente al obtenido en muestras sin conservante (98%), poniendo de manifiesto que el azidiol retrasó las pérdidas de actividad antimicrobiana de la penicilina G en este método.

Al comparar estas pérdidas de actividad antimicrobiana con las que se obtuvieron para la amoxicilina y la ampicilina se aprecia, en general, que las pérdidas para la penicilina G fueron mucho más elevadas que para la amoxicilina (Figura 12) y la ampicilina (Figura 20) en los tres métodos, alcanzando porcentajes muy elevados en los métodos BRT AiM® (98%) y Delvotest® Accelerator (100%) a los 3 días de refrigeración.

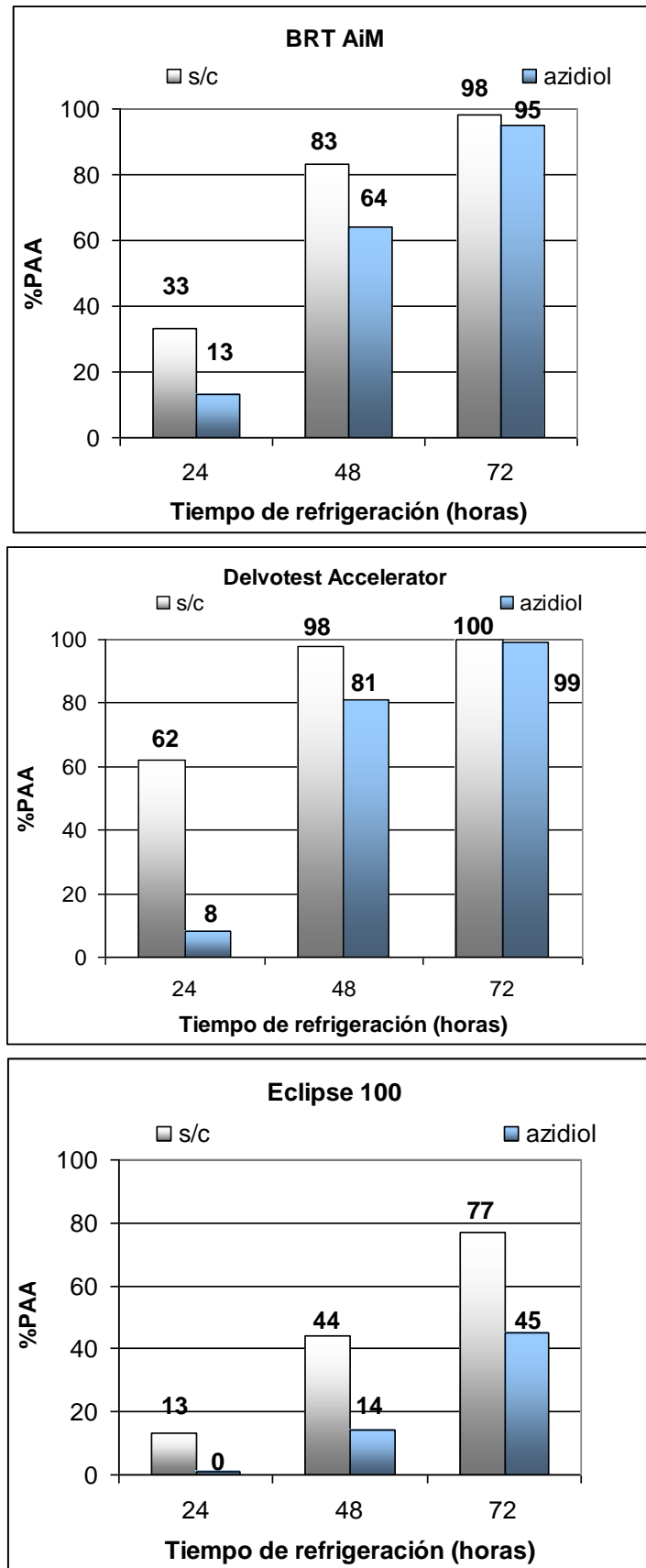


Figura 26. Efecto del tiempo de refrigeración sobre las pérdidas relativas de actividad antimicrobiana (PAA) de penicilina G leche sin conservante y con azidiol

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 (1989b) obtuvieron un residuo constante de penicilina G en muestras de leche con 20 y 100 µg/kg, cuando las muestras se refrigeraron durante más de 6 días a 4 °C.

Por el contrario Haagsma (1993), si demostró que aproximadamente el 60% de penicilina G en leche se destruye dentro de las 48 h a 2 °C, y que esta cifra de pérdida de actividad alcanza el 75% cuando la temperatura de conservación empleada es de 22 °C.

También, Roca y col. (2008) mediante técnicas de HPLC para la cuantificación de la modificación de penicilina G (4 µg/Kg) durante el almacenamiento, calculó una degradación del 21,4% a las 72 horas cuando las muestras de leche son refrigeradas a 4 °C.

2.2. Oxitetraciclina

En el estudio estadístico de los factores de variación (concentración, tiempo de refrigeración y presencia de conservante) de la respuesta de los métodos BRT[®] AiM, Delvotest[®] Accelerator y Eclipse[®] 100 (Cuadro 21), se observó el efecto altamente significativo ($p < 0,001$) de la concentración y del tiempo de refrigeración global en la respuesta de los métodos. En cuanto al azidiol, el nivel de significación también resultó alto para el Eclipse[®] 100 pero para el BRT[®] AiM y Delvotest[®] Accelerator el nivel de significación fue menor ($p < 0,05$).

Cuadro 21. Efecto de la concentración de oxitetraciclina, del tiempo de refrigeración y de la presencia de azidiol en las muestras de leche sobre la respuesta de los métodos microbiológicos

Método	Concentración		Tiempo refrigeración		Azidiol	
	Valor χ^2	Valor p	Valor χ^2	Valor p	Valor χ^2	Valor p
BRT [®] AiM	760,723	0,0000	279,752	0,0000	8,214	0,0042
Delvotest [®] Acc.	856,002	0,0000	102,810	0,0000	4,807	0,0283
Eclipse [®] 100	859,436	0,0000	53,655	0,0000	117,095	0,0000

Delvotest Acc.: Delvotest[®] Accelerator

En el Cuadro 22 se exponen las ecuaciones calculadas para la predicción de resultados positivos en el análisis de la oxitetraciclina en los métodos microbiológicos en muestras refrigeradas y los coeficientes de concordancia obtenidos mediante el modelo de regresión logística. Estos valores de concordancia fueron similares para el BRT[®] AiM (80,91%) y Eclipse[®] 100 (81,89%), mientras que para el método Delvotest[®] Accelerator (94,30%) resultó más elevada.

Cuadro 22. Ecuaciones de predicción para los métodos microbiológicos empleados en la detección de oxitetraciclina en la leche

Método	$L = \beta_0 + \beta_1 C_i + \beta_2 R_j + \beta_3 A_k$	C (%)
BRT [®] AiM	$L = -14,8932 + 0,414493[\text{oxi}] - 0,147408R + 1,04771A$	80,91
Delvotest [®] Acc.	$L = -35,6323 + 0,150086[\text{oxi}] - 0,00541918R + 0,935992A$	94,30
Eclipse [®] 100	$L = -12,8325 + 0,222034[\text{oxi}] - 0,0214989R + 0,516378A$	81,89

Delvotest Acc.: Delvotest[®] Accelerator; L: $\ln(\text{Probabilidad (+)}/1 - \text{Probabilidad (+)})$; [oxi]: concentración de oxitetraciclina; R: tiempo de refrigeración; A: azidiol (sin conservante=0 y con azidiol=1); C: concordancia

A fin de visualizar los cambios que se produjeron en los resultados a medida que se incrementó la concentración de oxitetraciclina y las horas de refrigeración, se han elaborado las curvas dosis-respuesta para el método BRT AiM[®]: Figuras 27 y 28, Delvotest[®] Accelerator: Figuras 29 y 30 y Eclipse[®] 100: Figuras 31 y 32, tanto para muestras sin conservante como aquellas con azidiol.

El método BRT AiM[®] (Figuras 27 y 28) que presentó una pendiente más elevada (Cuadro 16), necesitó menor incremento en la concentración de oxitetraciclina para producir un cambio en la respuesta del método. En cambio, los otros métodos necesitaron concentraciones más elevadas. Además en este método se apreció que con la refrigeración de las muestras con oxitetraciclina se produjo un descenso más rápido de los resultados positivos, seguido del Delvotest[®] Accelerator (Figuras 29 y 30). En cambio, en el Eclipse[®] 100 (Figuras 31 y 32) los resultados positivos se mantuvieron más estables con las horas de refrigeración y estos valores mejoraron con el conservante.

Cuando se realiza el análisis estadístico de las diferentes horas de refrigeración por separado (Cuadro 23), se pone de manifiesto que las muestras analizadas con el método BRT AiM[®] ya a las 24 horas presentaron diferencias significativas con respecto a las muestras sin refrigerar. En cambio, el método Delvotest[®] Accelerator estas diferencias surgieron después de un periodo de 24 horas y en el Eclipse[®] 100 a las 72 horas.

Cuadro 23. Efecto del tiempo de refrigeración sobre la respuesta de los métodos microbiológicos en muestras de leche con oxitetraciclina

Método	0-24 horas		0-48 horas		0-72 horas	
	Valor χ^2	Valor p	Valor χ^2	Valor p	Valor χ^2	Valor p
BRT [®] AiM	137,320	0,0000	61,421	0,0000	286,245	0,0000
Delvotest [®] Acc.	0,000	1,0000	0,0000	1,0000	143,033	0,0000
Eclipse [®] 100	0,000	1,0000	21,994	0,0000	56,988	0,0000

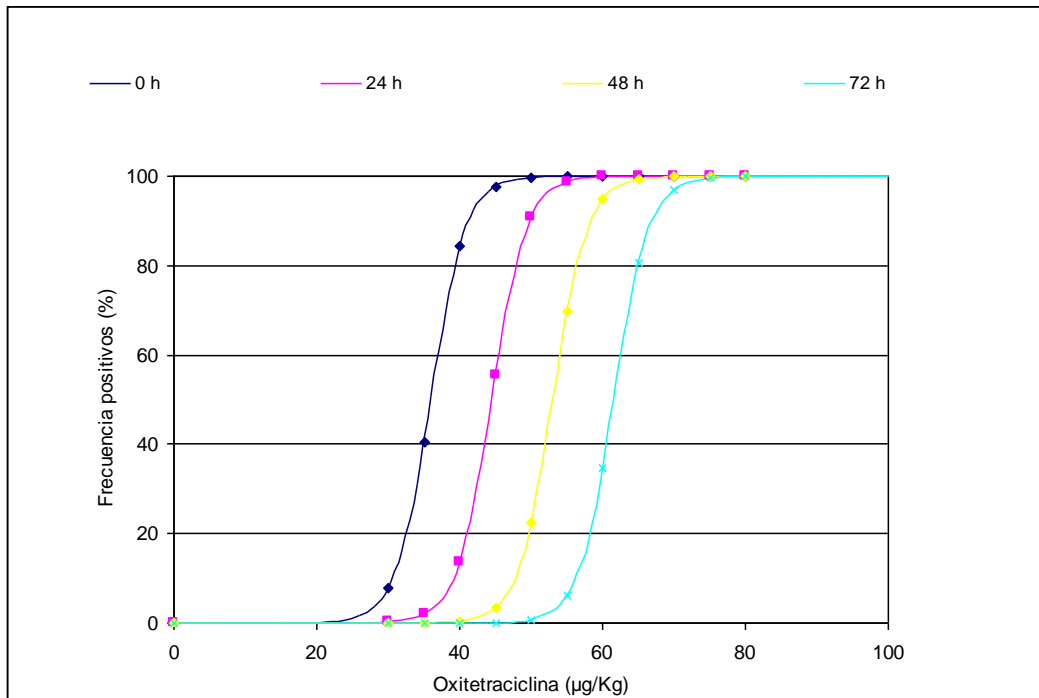


Figura 27. Curvas dosis-respuesta del método BRT AiM® en la detección de oxitetraciclina en muestras de leche sin conservante

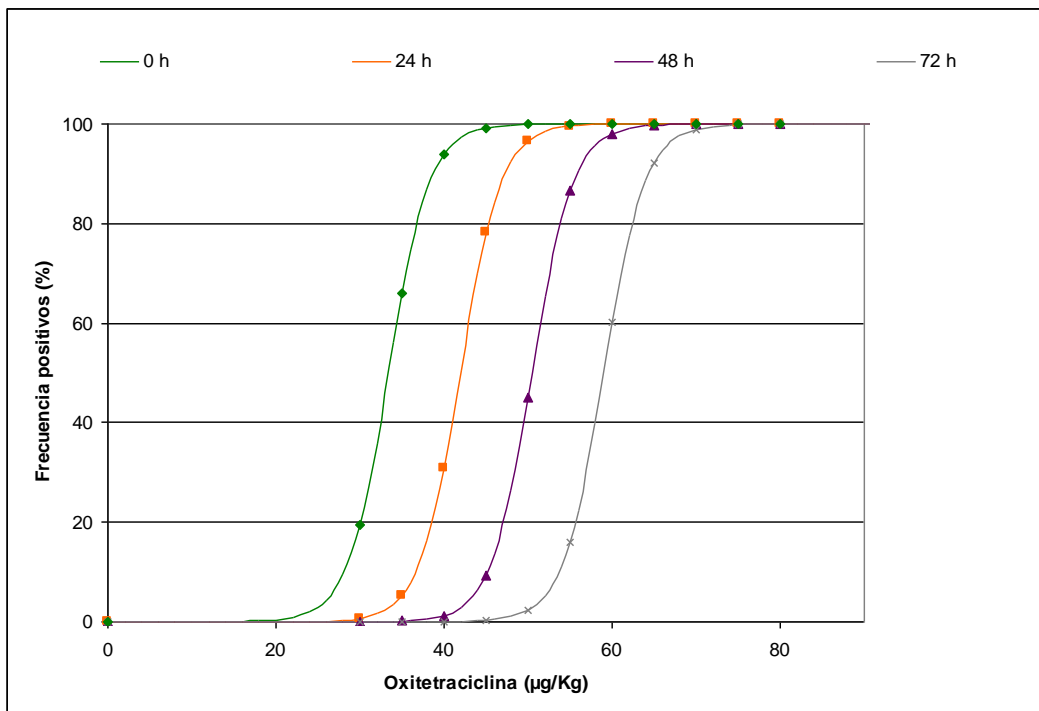


Figura 28. Curvas dosis-respuesta del método BRT AiM® en la detección de oxitetraciclina en muestras de leche con azidol

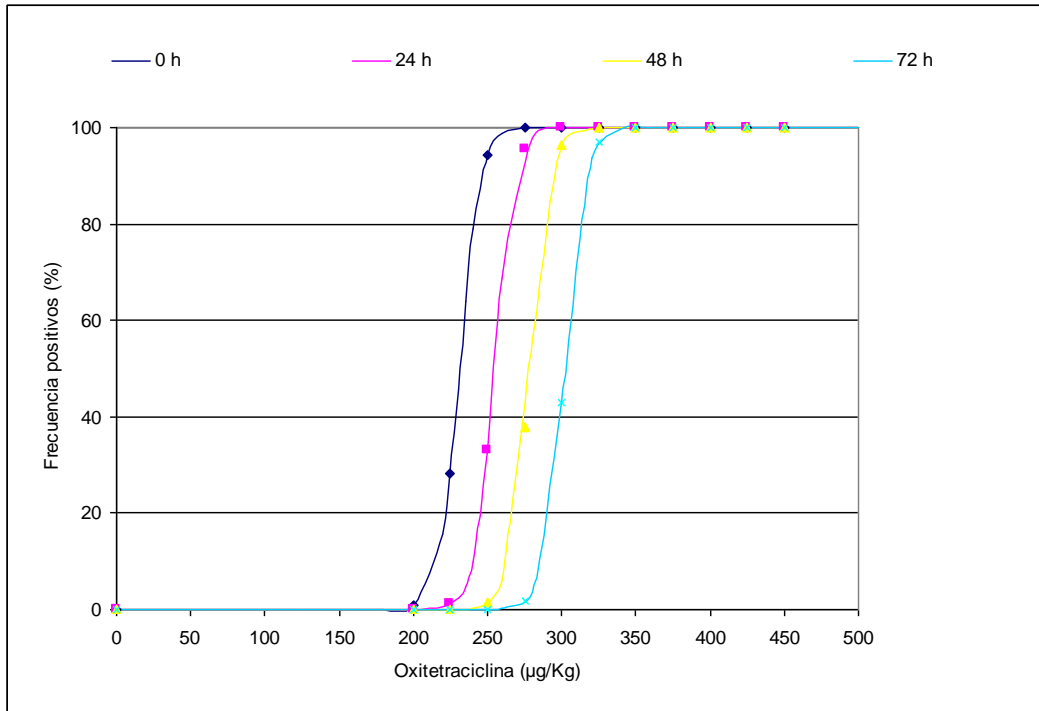


Figura 29. Curvas dosis-respuesta del método Delvotest® Accelerator en la detección de oxitetraciclina en muestras de leche sin conservante

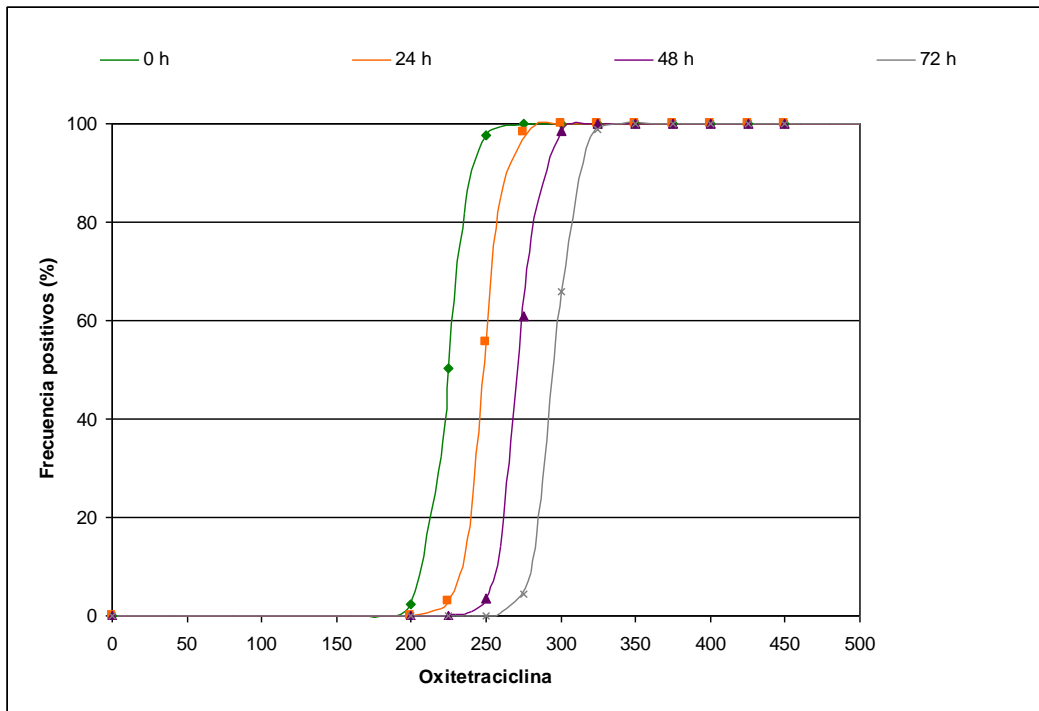


Figura 30. Curvas dosis-respuesta del método Delvotest® Accelerator en la detección de oxitetraciclina en muestras de leche con azidol

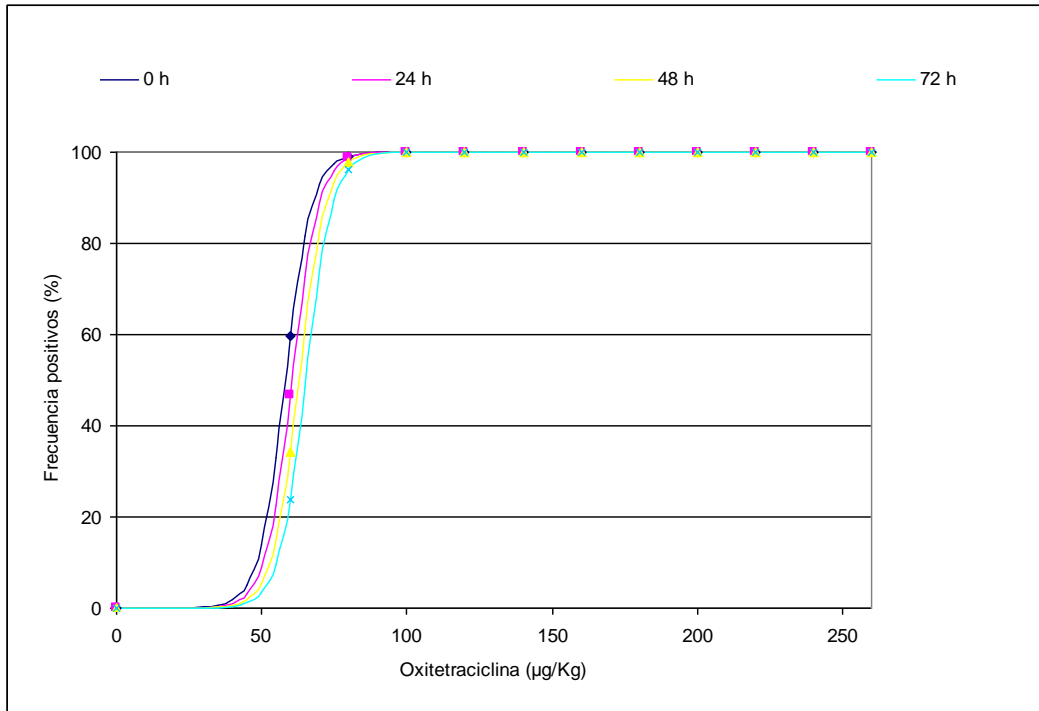


Figura 31. Curvas dosis-respuesta del método Eclipse® 100 en la detección de oxitetraciclina en muestras de leche sin conservante

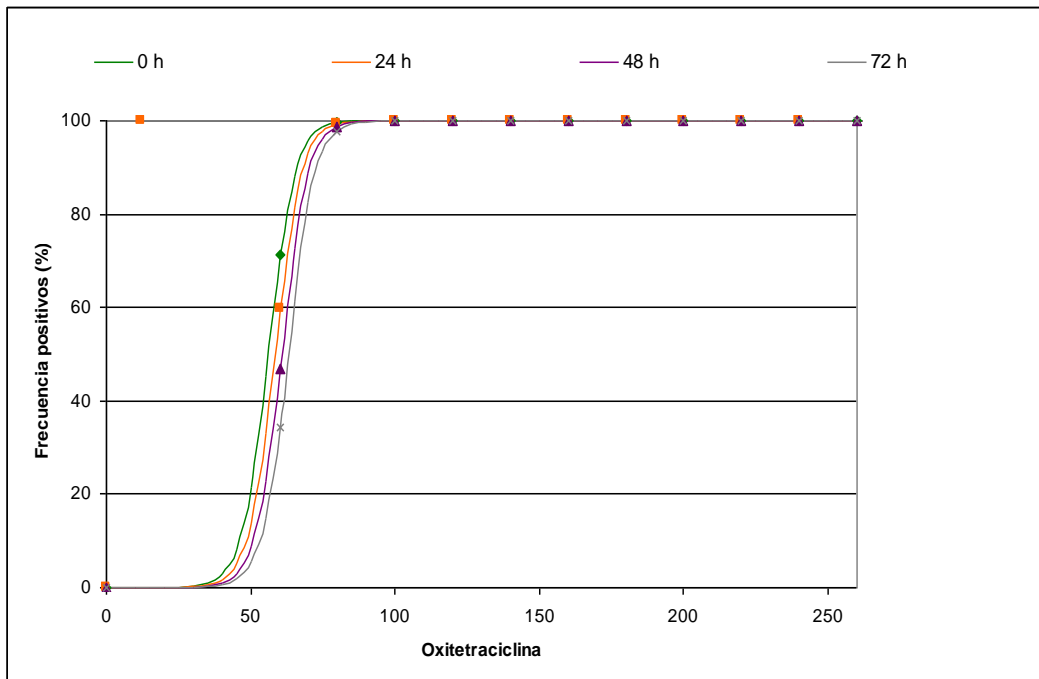


Figura 32. Curvas dosis-respuesta del método Eclipse® 100 en la detección de oxitetraciclina en muestras de leche con azidiol

Además, la presencia de conservante en la leche en el método BRT AiM[®] (Cuadro 24) presentó diferencias significativas a las 48 horas a diferencia de los otros métodos que hasta las 72 horas (3 días) el azidiol no tuvo un efecto significativo.

Cuadro 24. Efecto de la presencia de azidiol sobre la respuesta de los métodos microbiológicos en muestras de leche con oxitetraciclina

Método	0-24 horas		0-48 horas		0-72 horas	
	Valor χ^2	Valor p	Valor χ^2	Valor p	Valor χ^2	Valor p
BRT [®] AiM	0,000	1,0000	21,444	0,0000	21,835	0,0000
Delvotest [®] Acc.	0,000	1,0000	0,000	1,0000	21,994	0,0000
Eclipse [®] 100	0,000	1,0000	2,695	0,1007	56,988	0,0000

Para calcular las pérdidas relativas de actividad antimicrobiana, se calcularon los límites de detección de los diferentes métodos para la oxitetraciclina en muestras de leche sin conservante y sin refrigerar. El límite de detección calculado para las muestras de leche sin conservante y sin refrigerar en el método Delvotest[®] Accelerator (250,79 $\mu\text{g/Kg}$) se encuentran dentro de los límites establecidos por DSM Food (250-500 $\mu\text{g/Kg}$). En cambio para el BRT AiM[®] (43,03 $\mu\text{g/Kg}$) y Eclipse[®] 100 (71,05 $\mu\text{g/Kg}$) la concentración calculada fue inferior a la indicada por los fabricantes (100 y 150 $\mu\text{g/Kg}$, respectivamente)

Como se ha comentado anteriormente, con la aplicación del RD 1728/2007 y la obligación de implantar controles de detección de antibióticos betalactámicos y tetraciclinas, las casas comerciales han realizado modificaciones en los métodos para aumentar su sensibilidad para la detección de algunos antibióticos, en especial las tetraciclinas. En el caso concreto de la oxitetraciclina los límites de detección señalados por otros autores con anterioridad (Althaus y col. (2002); Molina y col. (2003b); Montero y col. (2005)) resultaron mucho más elevados que los calculados en el presente estudio.

Después de obtener los LD se calcularon las frecuencias de resultados positivos en muestras sin conservante y muestras con azidiol, con el objetivo de poder estimar si con la presencia de conservante las pérdidas relativas de actividad antimicrobiana fueron menores.

Las frecuencias de resultados positivos se presentan en el Cuadro 25, y como en todos los antibióticos los resultados positivos disminuyeron con las horas de refrigeración, siendo superiores en las muestras con azidiol, ya desde la primera hora de análisis cuando las muestras no habían sido refrigeradas (0 horas).

Cuadro 25. Efecto del tiempo de refrigeración y del azidol sobre el porcentaje de resultados positivos en los métodos microbiológicos para leche con oxitetraciclina

Horas de refrigeración	0	24	48	72
BRT[®] AiM				
Sin conservante	95	36	2	0
Azidiol	98	61	4	0
Delvotest[®] Accelerator				
Sin conservante	95	94	94	93
Azidiol	98	98	97	97
Eclipse[®] 100				
Sin conservante	95	92	87	80
Azidiol	97	95	92	87

Como en los antibióticos anteriores, a partir de la Ecuación III se estimaron las pérdidas relativas de actividad antimicrobiana (PAA) que se representan en la Figura 33 para los distintos métodos. A partir de de la Figura se pone de manifiesto, que para la oxitetraciclina el método BRT AiM[®] es el que presentó mayores pérdidas lo que podría ser debido a que el límite de detección fue más bajo de todos los métodos y cualquier modificación de la concentración podría estar afectando a la respuesta del método.

Además, por lo general en los tres métodos las pérdidas de las muestras con azidiol fueron prácticamente iguales que en las muestras sin conservante, por lo que en este caso conservar las muestras con azidiol no permite obtener menores pérdidas. Como se ha comentado anteriormente, la presencia de conservante retrasa el crecimiento microbiano, por lo que las muestras con azidiol pueden contener menos enzimas producidas por los microorganismos, como betalactamasas. Este hecho podría ser más manifiesto en el caso de los betalactámicos en donde la refrigeración durante más o menos tiempo sería la causa de una mayor liberación de betalactamasas, en especial en muestras sin conservante con mayores pérdidas de actividad de estos antibióticos pero no tendría porque influir a otro grupos o familias de antimicrobianos, como es el caso de las tetraciclinas.

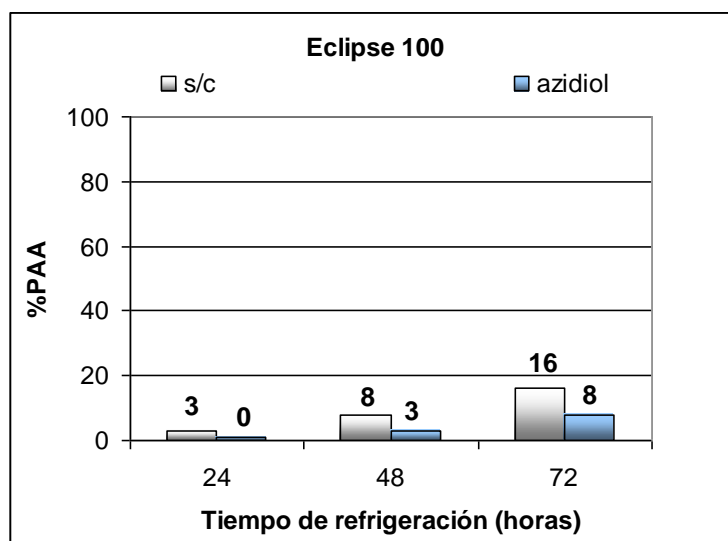
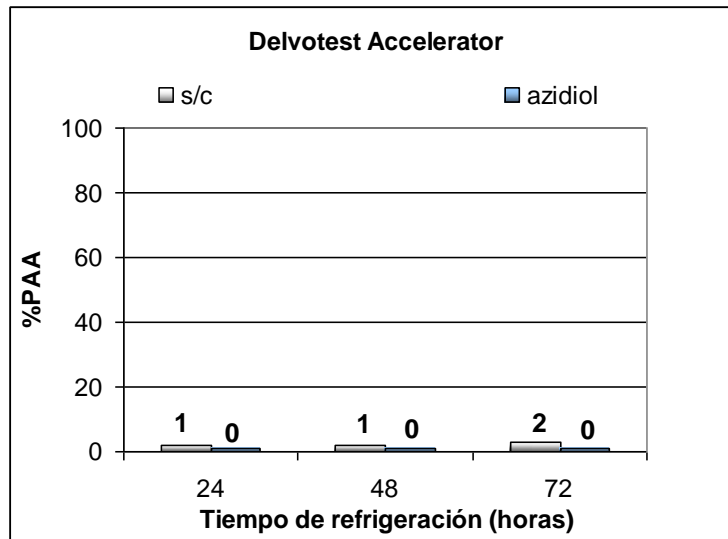
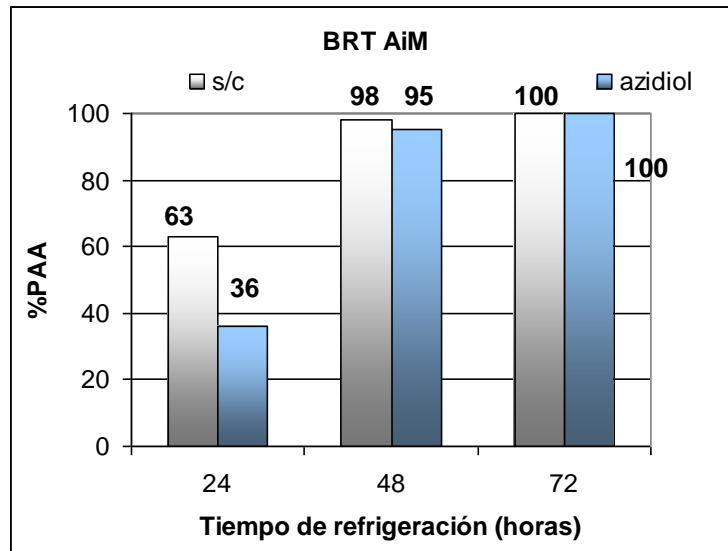


Figura 33. Efecto del tiempo de refrigeración sobre las pérdidas relativas de actividad antimicrobiana (PAA) de oxitetraciclina leche sin conservante y con azidiol

Todos los estudios sobre la influencia de la refrigeración de las muestras de leche con oxitetraciclina se centran en la degradación e inestabilidad de este antibiótico mediante técnicas que permiten cuantificar dicha pérdida. No se encontraron trabajos sobre la influencia del tiempo de refrigeración sobre la respuesta de métodos de tipo cualitativa como son los microbiológicos.

Podhorniak y col. (1999) evaluaron la estabilidad de tetraciclinas bajo condiciones de almacenamiento de la leche, y para ello fortificaron las muestras de leche con 50 µg/kg de tetraciclinas y las analizaron por HPLC después de ser mantenidas a 4 y 25 °C durante 24, 48 y 72 horas. No se 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 estudio realizado por Samanidou y col. (2007) sobre la validación de un método de confirmación HPLC para la determinación de 7 tetraciclinas en leche estudió la estabilidad de los antibióticos en los extractos obtenidos y refrigerados a 4 °C en la oscuridad, concluyendo que bajo estas condiciones, solo fueron estables durante una semana de almacenamiento.

También Roca y col. (2008) obtuvo un efecto significativo del tiempo de refrigeración a 4 °C sobre la estabilidad de tetraciclinas en la leche, en el caso de muestras de leche con 100 µg/Kg de oxitetraciclina a las 72 horas de refrigeración obtiene una degradación del 10,4%. Y Himanish y col. (2008) en un estudio sobre la estabilidad de la oxitetraciclina en leche obtiene pérdidas del 6-18% entre las 24 y 96 horas de refrigeración. Estos valores fueron similares a los calculados en el presente estudio para el método Eclipse® 100 en muestras sin conservante y refrigeradas 72 horas (16%).

V. CONCLUSIONES

De los resultados de este trabajo se deducen una serie de conclusiones sobre la influencia de los factores metodológicos “empleo de conservante” y “tiempo de refrigeración” de las muestras de leche sobre la respuesta de los métodos microbiológicos de cribado:

Primer estudio: Efecto de la refrigeración sobre la sensibilidad de los métodos microbiológicos en muestras de leche sin conservante y con azidiol

- La refrigeración durante 7 días de muestras de leche con antibióticos betalactámicos (amoxicilina, ampicilina, y penicilina G), ensayados a concentraciones del LMR, no afecta a la sensibilidad de los métodos BRT[®] AiM y Delvotest[®] Accelerator. En cambio, el método Eclipse[®] 100 presentó valores de sensibilidad más variados que empiezan a disminuir a las 72 horas de refrigeración.
- En la detección de oxitetraciclina, estudiada a una concentración más elevada equivalente a dos veces el LMR, los métodos BRT[®] AiM y Eclipse[®] 100 no presenta una disminución de la sensibilidad con la refrigeración de la leche. El método Delvotest[®] Accelerator presenta sensibilidades del 50% ya en muestras de leche sin refrigerar, que disminuye con la refrigeración de la leche.
- Con la presencia de azidiol en la leche las sensibilidades calculadas resultan iguales o más elevadas respecto a la leche sin conservante.

De forma general en este primer estudio se puede concluir que la refrigeración de las muestras de leche durante 3 días (72 horas) sin emplear conservante y hasta 7 días con azidiol, no afecta a la sensibilidad de los métodos BRT[®] AiM, Delvotest[®] Accelerator y Eclipse[®] 100 para la detección de amoxicilina, ampicilina, penicilina G (LMR) y oxitetraciclina (2LMR).

Segundo estudio: Efecto de la refrigeración sobre la pérdida de actividad antimicrobiana de los antibióticos en la leche

En cuanto a los resultados del segundo estudio, en el que se estima la influencia de la refrigeración de las muestras de leche sobre las pérdidas de actividad antimicrobiana de los distintos antibióticos se puede concluir:

- El tiempo de refrigeración y la presencia de 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 disminuyó al

aumentar el tiempo de refrigeración. Sin embargo es importante resaltar que, en todo momento, los resultados positivos fueron más elevados en 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 de la amoxicilina, ampicilina, penicilina G y oxitetraciclina aumentan con el tiempo de conservación y son menores en las muestras con azidiol. Por otro lado, estas pérdidas en los antibióticos betaláctámicos se detectan de una manera más evidente mediante los métodos microbiológicos cuya respuesta se basa en reacciones acido-base (Delvotest[®] Accelerator y Eclipse[®] 100).

Desde un punto de vista práctico, se puede resumir que sería conveniente que las casas comerciales aproximen los límites de detección al LMR para evitar resultados “no conformes” y evitar penalizaciones injustas a los ganaderos. Por otro lado, resultaría conveniente refrigerar las muestras de leche el mínimo tiempo posible antes de su análisis, y en caso de tener que refrigerar la leche sería conveniente utilizar azidiol, ya que las pérdidas son menores con la presencia de conservante.

Por último, hay que indicar que independientemente de estas conclusiones puntuales, los resultados de este trabajo establecen un punto de partida para futuros estudios sobre la influencia de los factores metodológicos relacionados con la toma de muestras sobre otros métodos de detección de diferente base analítica, así como para el establecimiento de protocolos de análisis en el caso de la detección de inhibidores. 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.

VI. BIBLIOGRAFÍA

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.

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.

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.; Berruga I.; Molina A.; Molina, M. P. 2008. "Influencia de la refrigeración de las muestras de leche sobre los métodos microbiológicos de detección de inhibidores en leche de oveja". *Actas: 397-401. XXXIII Jornadas Científicas y XII Jornadas Internacionales de ovinecología y caprinecología. Almería.*

Cullor J. S., Van Eenennaam A., Gradner Y., Peranil L., Dellinger J., Smisth W. L., Thompson T., Payne M. A., Jensen L., Guterbock W. M. 1994. "Performance of various test used to screen antibiotic residues in milk samples from individual animals". *J. AOAC Int.*, 77: 862-870.

Decisión 2002/657/CEE del Consejo del 12 de Agosto de 2002 por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados. *Diario Oficial nº L 73: 30-31.*

Demoly P., Romano A. 2005. "Update on Beta-lactam allergy diagnosis". *Curr. Allergy Asthma Rep.*, 1: 9-14.

Directiva 96/23/CEE del Consejo, de 29 de abril de 1996, relativa a las medidas de control aplicables respecto de determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos y por la que se derogan las Directivas 85/358/CEE y 86/469/CEE y las Decisiones 89/187/CEE y 91/664/CEE. *Diario Oficial nº L 125: 10-32.*

Doneva M. 1988. "Effect of low temperature storage of broiler carcasses on the stability of residual tetracyclines and oleandomycin in the meat". *Vet. Sb.*, 86: 54-55.

Erskine R. J., Wagner S., DeGraves F. J. 2003. "Mastitis 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. IDF S. I. Nº 9505.IDF. Bruselas, Bélgica.*

Frank S. 1995. "Bestimmung der Nachweisgrenzen ausgewählter Antibiotika und Sulfonamide im Brillantschwarz-Reduktionstest". *Diss. Universität Diplomarbeit Theier. Triesdorf, Germany. 70 pp.*

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 EuroResidue II Conference on Residues of Veterinary Drugs in Food. Ed. Haagsma, N.; Ruiter, A.; Czedik-Eysenberg, P. B., Veldhoven, Holanda.*

- Heesch W. H. 1993. "Residues of antibiotics and sulfonamides in milk". 3-12. In *Inhibitory substances in milk-current analytical practice*. IDF Bull N° 283, International Dairy Federation, Bruselas, Bélgica.
- Heesch 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, Bélgica.
- 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., Reybrowck W. 1997. Antimicrobials. 26-34. *In Residues and contaminants in milk and milk products*. IDF S.I. n° 9701. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica.
- IDF (International Dairy Federation). 1991. "Detection and confirmation of inhibitors in milk and milk products". International IDF Standard N° 258. Bruselas, Bélgica.
- IDF (International Dairy Federation). 1995. "Milk and milk products. Guidance on sampling". International IDF Standard N° 50C. Bruselas, Bélgica.
- IFAH (International Federation for Animal Health). 1997. "Antibiotics and animals". IFAH. Bruselas, Bélgica
- IFAH (International Federation for Animal Health). 1999. "Antibióticos para animales". IFAH. Bruselas, Bélgica.
- IFAH (International Federation for Animal Health). 2001. "Antibiotic use in farm animals does not threaten human health". IFAH. Bruselas, Bélgica.
- IFAH (International Federation for Animal Health). 2006. "Annual Report". IFAH. Bruselas, Bélgica
- ISO/FDIS 2002. "Guidelines for a standardized description of microbial inhibitor test". ISO/FDIS 13969/FIL 183:International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica.
- Mateos P. F. 2002. "Agentes antimicrobianos y microorganismos". Curso de microbiología. Ingeniería de Alimentos. http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/apua-cuba/a3-agentes_antimicrobianos_y_microorganismos.pdf
- 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., Molina A., Fernandez N. 2003b. "Antimicrobial agent detection in ewes milk by the microbial inhibitor test brilliant test-BRT AiM®". *Inter. 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 (2-3): 229-237.
- 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.
- Mourot D., Loussouarn S. 1981. "Sensibilité des ferments lactiques aux antibiotiques utilisés en médecine vétérinaire". *Rec. Med. Vét.*, 157: 175-177.
- Muller 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, Bélgica.

O'Brien J. J., Campbell N., Conaghan T. 1981. "The effect of cooking and cold storage on biologically active antibiotic residues in meat". *J. Hyg.* 87: 511-523.

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.

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.

Recomendación 2002/77/CEE del Consejo, de 15 de noviembre de 2001, sobre la utilización prudente de los agentes antimicrobianos en la medicina humana. *Diario Oficial L n° 34:13-16.*

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, n° 43. 7802:7806.

Real Decreto 1728/2007 de 21 de diciembre, por el que se establece la normativa básica de control que deben cumplir los operadores del sector lácteo y se modifica el Real Decreto 217/2004, de 6 de febrero, por el que se regulan la identificación y registro de los agentes, establecimientos y contenedores que intervienen en el sector lácteo, y el registro de los movimientos de la leche. *BOE*, 17 de enero de 2008, n° 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 n° 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 1831/2003/CEE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2003, sobre los aditivos en la alimentación animal. *Diario Oficial n° L 268: 29-43.*

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.*

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.* v. 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". Actas: 89-92. XXXII Jornadas Científicas y XI Jornadas Internacionales de Ovinotecnia y Caprinotecnia, Mallorca.
- Roca M., Molina P., Borrás M., 2007. "Evaluación de la validez en la determinación-semicuantificación de los residuos de antibióticos en la leche cruda de vaca para los métodos comercializados en España". Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid. 92 pp.
- 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. DF, Mexico.
- 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.
- 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.
- SAS Institute Inc., 2001. SAS users guide: Statistics version 9.1. SAS Institute Cary, NC.
- 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.
- Shenck 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.
- 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.
- Spisso B. F., De Oliviera E Jesus 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.
- 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.
- Shuren G., Reichmuth J., 1998. "Nachweis von β -laktamantibiotikarückständen in milk-Erfahrungen mit dem SNAP-Beta-Laktamtest. D.M.Z. Lebensmittelindustrie und Milchwissenschaft, 119: 674-681.
- Sierra D., Sanchez A., Contreras A., Luengo C., Corrales J.C., Morales C.T., de la Fe C., Guirao I., Gonzalo C. 2009. "Detection limits of four antimicrobial residue screening tests for β -lactams in goat's milk". J. Dairy Sci., 92:3585-3591
- Verdon E., Fuselier R., Hurtaud-Pessel, D., Couedor P., Cadieu N., Laurantie M. 2000. Stability of penicillin antibiotic residues in meat during storage. Ampicillin". J. Chromatogr., 882: 135-143.
- Veterindustria. 2006. "Guía de productos zoonosológicos 2005-2006". 9ª ed. Ed. Veterindustria, Madrid.
- Wiese B., Martin K. 1989b. "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., Vormeister 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.

ZeU-Inmunotec, 2008. "Eclipse 100". Informe técnico. Ed. ZEUI-NMUNOTEC S.L Zaragoza, 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 mastitis y calidad de la leche (G-Temcal), Palma de Mallorca.

Zorraquino M. A. 2005. Inactivación térmica de sustancias antimicrobianas en leche. Tesis Doctoral. Universidad Pública de Navarra.

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.

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.