

Resumen

La presencia de residuos de antibióticos en la leche y los productos derivados representa un riesgo para la salud del consumidor, ya que estas sustancias podrían dar lugar a efectos toxicológicos y ser la causa potencial de la aparición de resistencias antimicrobianas. Para garantizar la seguridad alimentaria, la legislación europea ha establecido Límites Máximos de Residuos (LMRs) para los medicamentos veterinarios en la leche cruda. Sin embargo, en la mayoría de los países no se han fijado niveles de seguridad para los productos lácteos, y los consumidores podrían estar expuestos a cantidades significativas de esas sustancias. Además, la transferencia de antibióticos de la leche a la cuajada y al lactosuero durante el proceso de elaboración del queso apenas ha sido estudiada y, por tanto, hasta el momento se desconoce el impacto de la utilización de lactosuero con residuos de antibióticos en la fabricación de diferentes alimentos destinados al consumo humano o en su empleo en la alimentación animal.

El objetivo de esta tesis fue evaluar la transferencia de antibióticos de la leche a las fracciones queso y lactosuero, así como la validación de las características de varios métodos de cribado para la detección de antibióticos en muestras de suero de leche. Para ello, se llevaron a cabo diferentes experimentos agrupados en dos estudios.

En el primer estudio, el objetivo específico fue validar un método UHPLC-HRMS multi-residuo utilizando el analizador Orbitrap Exactive™, para el cribado cuantitativo de antibióticos en muestras de leche, queso fresco y lactosuero. El proceso de validación se llevó a cabo de acuerdo con los criterios especificados en la Decisión 657/2002/CE de la Comisión, utilizando muestras de las tres diferentes matrices lácteas procedentes de vacas, ovejas y cabras, fortificadas con antibióticos pertenecientes a diferentes familias de antimicrobianos. Después de la validación, se empleó el método UHPLC-HRMS para evaluar la distribución de 36 antibióticos, entre la cuajada y el lactosuero, durante un procedimiento de elaboración de queso a escala de laboratorio, utilizando leche de cabra fortificada con cinco concentraciones de antibióticos, comprendidas entre 0,25 y 4 veces el LMR.

El estudio de distribución indicó que la mayor parte de antibióticos se transfirieron principalmente de la leche a la fracción lactosuero (hasta el 85,9%) durante la elaboración de queso. Por tanto, los porcentajes de retención de antibióticos en la cuajada fueron inferiores al 50%, excepto en el caso del ceftiofur (59,7%) y la dicloxacilina (52,8%), y muy variables entre los distintos antimicrobianos. En la mayor parte de los casos, la distribución de medicamentos no se vio afectada por la

concentración de antibióticos presente en la leche para la producción de queso, y estuvo escasamente relacionada con la lipofilicidad de los antibióticos, lo que sugiere que se deben considerar factores distintos a las características de solubilidad de estas sustancias para explicar su transferencia en estas matrices lácteas.

En el segundo estudio, se evaluaron las características de diferentes métodos de detección de antibióticos en muestras de lactosuero de acuerdo con la Decisión 657/2002/CE de la Comisión, mediante la realización de tres experimentos centrados en la validación de métodos de cribado comercializados para la leche, en el desarrollo de bioensayos en placas microtiter con respuesta dicotómica y en la aplicación de un sistema multiplaca semicuantitativo, respectivamente.

La especificidad (porcentaje de falsos positivos) y la capacidad de detección (CC β) de un método de detección de inhibidores (Eclipse Farm provisto del dispositivo e-Reader) y de métodos de unión a receptores (3Aminosensor, Quinosensor, Twinsensor y Tylosensor) se evaluaron en muestras de lactosuero de leche de cabras, obteniendo en general, resultados similares a los obtenidos cuando se aplican para el análisis de la leche. Los métodos comerciales para el cribado de antibióticos en la leche, tanto el método de inhibición microbiana como los test de unión a receptores, fueron adecuados para la detección de residuos de antibióticos en muestras de lactosuero con valores de pH comprendidos entre 6,5 y 7,0, aunque en algún caso se realizaron ligeras modificaciones en el procedimiento de ensayo con objeto de mejorar el rendimiento del método. Así, se incluyó necesariamente una predifusión de las muestras de lactosuero en los viales del método antes de la incubación para obtener una lectura más adecuada de los resultados del análisis con Eclipse Farm provisto del dispositivo e-Reader.

Se evaluaron tres bioensayos en placa microtiter y respuesta dicotómica, que contenían *Bacillus subtilis*, *Geobacillus thermocatenulatus* y *Geobacillus thermoleovorans*, respectivamente, para ser aplicados simultáneamente con los métodos comercialmente disponibles basados en la utilización de *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*, con objeto de tratar de mejorar especialmente la detección de antibióticos no betalactámicos en muestras de suero. Elevados valores de especificidad (98-100%) se obtuvieron cuando las muestras de lactosuero fueron tratadas térmicamente (85°C, 10 min) antes de realizar el análisis. *Bacillus subtilis*, con menores valores de CC β para quinolonas y macrólidos, fue la opción más interesante para mejorar el perfil de detección del Eclipse 100 utilizado como representante de los métodos comerciales que generalmente se utilizan en los laboratorios de control de calidad de la leche.

En cuanto al sistema multiplaca *Screening Test for Antibiotic Residues* (STAR) que utiliza cinco microorganismos diferentes con sensibilidades complementarias (*Geobacillus stearothermophilus* para betalactámicos y sulfonamidas, *Bacillus subtilis* para aminoglucósidos, *Kocuria varians* para macrólidos, *Escherichia coli* para quinolonas y *Bacillus cereus* para tetraciclinas) aplicado al lactosuero, presentó una elevada especificidad ($\geq 98\%$) en la mayor parte de casos. Los valores de CC β obtenidos con el protocolo STAR en muestras de lactosuero superan el LMR establecido en la leche para la mayor parte de las sustancias consideradas. Sin embargo, este método podría representar una adecuada herramienta en la etapa de post-cribado para la identificación preliminar de los residuos de antibióticos presentes en el suero de leche y, por tanto, reducir el número de muestras destinadas al análisis cuantitativo por LC-MS/MS, que es un método mucho más complejo y costoso.

Los resultados obtenidos reafirman la necesidad de controlar la presencia de residuos de antibióticos en la leche cruda para evitar su llegada a la industria láctea y, por tanto, a los consumidores. La producción de queso a partir de leche con antibióticos genera residuos en el queso y especialmente en el lactosuero. Aunque en la mayor parte de países no se han establecidos límites de seguridad para los productos derivados de la leche como el lactosuero, las adecuadas características de los métodos de cribado ensayados para la detección de residuos de antibióticos en este importante subproducto de la elaboración del queso permitiría el establecimiento de una estrategia de control para evitar la presencia de antibióticos en el lactosuero y sus posibles efectos negativos sobre la salud pública, la sanidad animal y el medio ambiente.

