

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE BIOQUÍMICA Y CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Cátedra de Biofísica
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad Nacional del Litoral

**DISEÑO DE UN SISTEMA MICROBIOLÓGICO EN
MICROPLACAS ELISA (SMME) PARA LA DETECCIÓN E
IDENTIFICACIÓN DE RESIDUOS DE ANTIMICROBIANOS EN LA
LECHE**

AUTOR: Lic. Orlando Guillermo Nagel

DIRECTOR: Dr. Rafael Lisandro Althaus

CODIRECTORA: Dra. M^a Pilar Molina Pons

TESIS PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

- 2009 -

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE BIOQUÍMICA Y CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**DISEÑO DE UN SISTEMA MICROBIOLÓGICO EN MICROPLACAS
ELISA (SMME) PARA LA DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE
RESIDUOS DE ANTIMICROBIANOS EN LA LECHE**

AUTOR: Lic. Orlando Guillermo Nagel

DIRECTOR: Dr. Rafael Lisandro Althaus

CODIRECTORA: Dra. M^a Pilar Molina Pons

MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE TESIS:

Dra. Rosa Puchades Pla
Dr. Jose Di Conza
Dra. Beatriz Abraham

Santa Fe, 9 de diciembre de 2009

A mis padres y hermano...

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, deseo expresar mi profundo agradecimiento a mis directores de tesis Rafael Althaus y Maria Pilar Molina, por guiarme en esta etapa de mi vida profesional, por su amistad, por su trabajo y especialmente por ayudarme a no bajar los brazos en los momentos difíciles.

A la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral, especialmente a las autoridades, Dr. Jose Luis Peralta, Dr. Humberto Occhi y Dr. Alberto Kern, por brindarme la oportunidad de perfeccionarme como profesional y docente en esta institución, que cada día aprecio más.

A mis compañeros de trabajo de la Facultad de Ciencias Veterinarias, los profesores Cesar Gapel, Alberto Odaso, Jorge Bertero, Jorge Sosa, Daniel Alsina, Enrique Formentini y Eduardo Picco, por los consejos recibidos y por haberme acompañado en mis actividades de laboratorio.

Mi gratitud al Secretario de Vinculación Tecnológica Ing. Eduardo Matozo, al Director del Cetri Ing. Daniel Scacchi, al Dr. Rubén Romano por sus valiosas gestiones y apoyo desinteresado para que este trabajo constituya una investigación aplicada.

A la Universidad Nacional del Litoral, por la beca doctoral otorgada y por los proyectos de Investigación CAI+D: “Diseño y validación de un bioensayo de inhibición microbiológica para la detección de residuos antimicrobianos en leche” (CAI+D’05/07- PN° 33-213, Res. C.D. N° 302/04 del 16/12/2004 y “Sistema Microbiológico en microplacas (SMMP) para la detección e identificación de residuos de antibióticos en la leche” (CAI+D’09- PN° 33-173, Res C.S. N° 100/09 del 29/05/2009, que hicieron posible la realización de la presente tesis.

No quiero olvidar al Instituto de Ciencia y Tecnología de Animal de la Universidad Politécnica de Valencia, España, particularmente a Antonio, M^a Carmen, Milagros, Marta, Andrés, Yolanda, Fernando, María, Salvador, Helena, por la hospitalidad brindada durante mis estancias en Valencia.

Finalmente, a mis amigos de verdad, por entenderme, animarme y estar a mi lado siempre que lo he necesitado.

Y, sobre todo, a mi familia, por permanecer siempre junto a mí.

Publicaciones

- 1.- NAGEL, O. G.; ZAPATA, M. L.; BASÍLICO, J. C.; BERTERO, J.; MOLINA, M. P.; ALTHAUS, R. L. 2009. Effect of chloramphenicol on a bioassay response for the detection of tetracycline residues in milk. *J. Food and Drug Analysis*. 7(1): 36-42
- 2.- NAGEL, O. G.; MOLINA, M. P.; BASÍLICO, J. C.; ZAPATA, M. L.; ALTHAUS, R. L. 2009. Robust experimental design for optimizing the microbial inhibitor test for penicillin detection in milk. *Letters in Applied Microbiology*. 48: 744-749.
- 3.- NAGEL, O. G.; ZAPATA, M. L.; BASÍLICO, J. C.; MOLINA, M. P.; ALTHAUS, R. L. 2008. Estudio del sinergismo entre sulfamidas en leche y trimetoprim en un bioensayo que utiliza *Geobacillus stearothermophilus*. *Revista FAVE, Sección Ciencias Veterinarias*. Editorial de la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral. 8 (1): 15-27.

Presentaciones a Reuniones Científicas

- 1.- NAGEL, O. G.; MOLINA, M. P.; BASÍLICO, J. C.; ZAPATA, M. L.; ALTHAUS, R. L. 2005. Using experimental design to optimize a bioassay based on inhibition of *Bacillus stearothermophilus* for penicillin detection in milk. *in Innovations in Traditional Foods*. Ed. Polytechnical University of Valencia, Spain. Editor Petro Fito & Fidel Toldrá. ELSEVIER. Proceeding: 73-76.
- 2.- NAGEL, O.; ZAPATA, M.; BASÍLICO, J.; ALTHAUS, R.; PIDKOWA, V.; MOLINA, P. 2006. Estudio en microplacas del sinergismo de trimetoprim y sulfamidas sobre *Bacillus stearothermophilus*. XXVI Congreso Argentino de Química. San Luis, Argentina. 13-15/09/06.
- 3.- NAGEL, O.; ALTHAUS, R.; ZAPATA, M.; BASÍLICO, J.; BERTERO, J.; MOLINA, P. 2007. Método microbiológico para la detección de tetraciclinas en leche. XI Congreso CYTAL. 2º Simposio Internacional de Nuevas Tecnologías. Buenos Aires, Argentina. 12-14/09/07.
- 4.- NAGEL, O.; ALTHAUS, R.; MOLINA, P.; RIBERO, G. 2009. Inocuidad de la leche desde la salida del tambo. III Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Córdoba, Argentina. 15-17/04/2009.
- 5.- NAGEL, O.; ALTHAUS, R. L.; MOLINA, M. P.; RIBERO, G.; SAD, S. 2009. Identification of Antibiotic in milk by means of ResScreen® microbiological inhibitor test. IDF World Dairy Summit 2009. Berlín, Alemania. 20-24/09/2009.

RESUMEN

La presencia de residuos de sustancias antimicrobianas en la leche puede ocasionar problemas desde el punto de vista de la salud pública (alergias, trastornos digestivos, resistencias a medicamentos, etc.), además de ser la causa de interferencias en procesos de fermentación empleados en la industria láctea. Por ello resulta necesario establecer medidas de control que aseguren que la leche se encuentra libre de residuos y que cumple la legislación europea.

Los métodos de screening de tipo microbiológicos, detectan la simple presencia o ausencia de sustancias antimicrobianas en la leche mediante una respuesta de tipo dicotómica, en un tiempo relativamente breve (2 a 4 horas). Por el contrario, los “Sistemas Microbiológicos Multiplacas” o Multirresiduos (SMMP), que hacen uso de placas de Petri, logran identificar los residuos en familias de antibióticos mediante la medición de los diámetros de los halos inhibitorios como una variable continua. Estos sistemas demoran mucho tiempo en brindar una respuesta (18 a 24 horas) y resultan dificultosos de implementar como métodos de rutina en los laboratorios de control de calidad.

Por ello, haciendo uso de las técnicas del diseño experimental y del modelo de regresión logística como herramientas quimiométricas, se planificó diseñar y optimizar dos sistemas microbiológicos en microplacas (SMmp) que permitan detectar e identificar residuos de antibióticos de tres familias a niveles cercanos a sus Límites Máximos de Residuos (LMRs) en un tiempo comprendido entre 4 y 6 horas, mediante respuestas dicotómicas.

El primer sistema (SMmp1) emplea dos bioensayos que contienen esporas de *G. stearothermophilus* sensible a los antibióticos betalactámicos. Ambos métodos se potencian con la incorporación cloranfenicol (Bioensayo “BT”) y trimetoprim (Bioensayo “BS”) para mejorar la detección de residuos de tetraciclinas y sulfamidas, respectivamente. El segundo sistema (SMmp2) utiliza tres bioensayos que contienen esporas de *G. stearothermophilus* (Bioensayo “B”), *B. cereus* (Bioensayo “T”) y *B. subtilis* (Bioensayo “S”), para la identificación de residuos de betalactámicos, tetraciclinas y sulfamidas, respectivamente. Estos métodos emplean medios de cultivos, indicadores y sustancias antimicrobianas adecuadas que mejoran la detección de estos residuos.

Para SMmp1, los resultados indican que, la incorporación de 400 µg/l de cloranfenicol (Bioensayo “BT”) y 60 µg/l de trimetoprim (Bioensayo “BS”) presentan

adecuadas selectividades (97.9% y 95.8%, respectivamente). Además, se detectan residuos de betalactámicos, tetraciclinas y sulfamidas a niveles próximos a sus LMRs. La identificación de estos residuos se lleva a cabo mediante la interpretación simultánea de ambos métodos. Los antibióticos betalactámicos presentan resultados positivos a los dos bioensayos, las tetraciclinas producen resultados positivos a Bioensayo "BT" y negativos a "BS", mientras que las sulfamidas brindan resultados positivos a Bioensayo "BS" y negativos a "BT".

En el SMmp2, el uso de tres métodos permite revelar un elevado número de antibióticos (25) a niveles similares a sus LMRs, a excepción de estreptomina y kanamicina. En este sentido, betalactámicos, neomicina, lincomicina y tilosina son detectados por Bioensayo "B", tetraciclinas y eritromicina por Bioensayo "T", mientras que sulfamidas, quinolonas, tetraciclinas, macrólidos, neomicina y algunas penicilinas por Bioensayo "S".

A modo de síntesis, una adecuada estrategia analítica para "*detectar*" una amplia cantidad de antimicrobianos en leche, se logra cuando se emplean simultáneamente los Bioensayos "BT" (betalactámicos y tetraciclinas, tilosina) y Bioensayo "S" (sulfamidas, quinolonas, macrólidos, neomicina).

Una adecuada "identificación" de residuos se obtiene por medio de dos combinaciones de bioensayos procedentes de ambos SMmp. Una estrategia analítica consiste en emplear la combinación de los Bioensayos "BT", "BS" y "S" y la otra alternativa es utilizar los Bioensayos "B", "T", "S" y "BS". Para ambas combinaciones de métodos, se puede identificar residuos de betalactámicos, tetraciclinas, sulfamidas y quinolonas, aunque lincomicina, gentamicina, neomicina, tilosina, eritromicina y espiramicina presentan problemas de especificidad cruzada.

Los resultados del presente trabajo constituyen una primera etapa en el diseño y la optimización de "Sistemas Microbiológicos en microplacas" (SMmps) para detectar e identificar residuos provenientes de cuatro familias de antibióticos. Sin embargo, en un futuro, sería conveniente diseñar y optimizar otros bioensayos que utilicen diferentes microorganismos (*B. megaterium*, *B. pumilus*, etc.), o emplear la prueba de la penicilinasasa para aclarar los problemas de especificidad cruzada y ampliar el número de familias de antibióticos a identificar.

SUMMARY

The presence of residues of antimicrobial substances in milk can give rise to problems from the point of view of public health (allergies, digestive disorders, resistance to medicines, etc.), in addition to being the cause of interference in fermentation processes used in the dairy industry. It is therefore necessary to set out control measures to ensure that milk is free of residues, in compliance with the legislation.

The microbiological inhibition test detected the simple presence or absence of antimicrobial substances in milk using a dichotomous response rate in a relatively short time (2 to 4 hours). By contrast, the "System Microbiological Multi-plate" or multi-residue (SMMP) that make use of Petri dishes, able to identify residues in antibiotic families by measuring the diameters of the inhibitory halos as a continuous variable. These systems take a long time to provide a response (18 to 24 hours) and are difficult to implement as routine methods in the laboratories quality control.

Thus, using experimental design techniques and logistic regression model as chemometric tools, we planned to design and optimize two "Systems Microbiological in microplates" (SMmp) to detect and identify antibiotic residues from three families to levels close to their Maximum Residue Limits (MRLs), in a period between 4 and 6 hours using dichotomous responses.

The first system (SMmp1) employs two bioassays containing spores of *G. stearothermophilus* sensitive to beta-lactam antibiotics. Both methods are enhanced by incorporating chloramphenicol (Bioassay "BT") and trimethoprim (Bioassay "BS") to improve the detection of residues of tetracyclines and sulfonamides, respectively. The second system (SMmp2) uses three bioassays containing spores of *G. stearothermophilus* (Bioassay "B"), *B. cereus* (Bioassay "T") and *B. subtilis* (Bioassay "S"), to identify residues of beta-lactams, tetracyclines and sulfonamides, respectively. These methods use culture media, appropriate indicators and antimicrobial substances that improve the detection of these residues.

For SMmp1, the results indicate that the addition of 400 µg/l of chloramphenicol (Bioassay "BT") and 60 µg/l of trimethoprim (Bioassay "BS") show adequate selectivity (97.9% and 95.8% respectively). Also, residues of beta-lactams, tetracyclines and sulfonamides are detected at levels near their MRLs. The identification of this residues is carried out through simultaneous interpretation of both methods. Beta-lactam antibiotics present positive results for the two bioassays, tetracyclines produce positive

results in the response of Bioassay "BT" and negative in Bioassay "BS", while sulphonamides cause positive results in Bioassay "BS" and negative in Bioassay "BT".

In SMmp2, using three methods to detect a large number of antibiotics (25) to levels similar to their MRLs, except for streptomycin and kanamycin. Thus, lactam, neomycin, lincomycin and tylosin are detected by Bioassay "B", tetracycline and erythromycin by Bioassay "T", whereas sulfonamides, quinolones, tetracyclines, macrolides, neomycin and some penicillin by Bioassay "S".

To summarize, the simultaneous use of Bioassay "BT" (beta-lactams, tetracycline, tylosin) and Bioassay "S" (sulfonamides, quinolones, macrolides, neomycin) provide an appropriate analytical strategy for "*detecting*" antibiotic residues in milk.

A proper "*identification*" of residues is obtained by means of two combinations of bioassays from both SMmp. An analytical strategy is to use the combination of the Bioassay "BT", "BS" and "S" and the other alternative is to use Bioassays "B", "T", "S" and "BS". For both combinations of methods, one can identify residues of beta-lactams, tetracycline, sulfonamides and quinolones, although lincomisina, gentamicin, neomycin, tylosin, erythromycin and spiramycin have problems with cross-specificity.

The results of this study constitute a first step in the design and optimization of "Microbial Systems in microplates" (SMmps) to detect and identify residues from four families of antibiotics. However, in future, it would be desirable to design and optimize other bioassays using different microorganisms (*B. megaterium*, *B. pumilus*, etc.), or use the penicillinase test to clarify the cross-specificity problems and increase the number of antibiotic families to identify.

Índice general

I. Introducción.	1
I.1. Medicamentos utilizados en el tratamiento del ganado vacuno.	1
I.1.1. Consideraciones previas.	1
I.1.2. Clasificación y características de las sustancias antimicrobianas	2
I.1.3. Uso de antibióticos en tratamientos del ganado vacuno productor de leche	6
I.1.4. Frecuencia de antimicrobianos empleados en el ganado vacuno lechero	9
I.2. Residuos de antibióticos en la leche	14
I.2.1. Origen de los residuos de antibióticos en la leche	14
I.2.2. Evolución de la frecuencia de residuos de antibióticos en la leche	16
I.2.3. Principales antibióticos detectados en la leche	18
I.2.4. Efectos de la presencia de residuos de medicamentos.	20
I.2.5. Aspectos legales	22
I.2.5.1. Límites máximos de residuos de antibióticos en la leche	23
I.2.5.2. Determinación de los límites máximos de residuos.	25
I.3. Detección de residuos de antimicrobianos en la leche	28
I.3.1. Sistema integrado para la detección de antibióticos.	28
I.3.2. Métodos de cribado o screening	31
I.3.2.1. Métodos de inhibición microbiológicos	31
I.3.2.1.1. Principales métodos microbiológicos comerciales.	33
I.3.2.1.2. Mejoras en los métodos microbiológicos para la detección de antibióticos.	35
I.3.2.2. Métodos específicos	37
I.3.2.3. Sistemas Microbiológicos Multiplaca (SMMP)	38
I.3.3. Métodos de cuantificación	39
I.3.4. Propiedades de los métodos cualitativos	40
I.3.4.1. Límites de detección.	41
I.3.4.2. Sensibilidad	46
I.3.4.3. Reproducibilidad.	48
I.3.4.4. Selectividad	51
I.3.4.5. Robustez	52
I.4. Sistemas Microbiológicos Multiplaca (SMMP)	53
I.4.1. SMMP para la detección de residuos de antibióticos en matrices cárnicas	54
I.4.2. SMMP para la detección de residuos de antibióticos en leche	60
I.4.3. Características de los SMMP para su implementación en el control de residuos.	66
II. Objetivos	68
III. Materiales y métodos.	71
III.1. Materiales	71
III.1.1. Equipos, reactivos y material de laboratorio	71

III.1.2. Suspensiones bacterianas.	73
III.1.2.1. Preparación de suspensiones bacterianas.	73
III.1.3. Preparación y conservación de los bioensayos.	75
III.1.4. Estudios de selectividad	76
III.1.5. Disoluciones de fármacos y muestras fortificadas	76
III.1.6. Estudio de los límites de detección	78
III.1.7. Interpretación de los resultados	79
III.1.8. Cálculo de los Límites de detección de los bioensayos	79
III. 2. Diseño, optimización y validación del SMmp1 (<i>G. stearothermophilus</i>).	80
III.2.1. Diseño robusto de un bioensayo para la detección de penicilina en leche	81
III.2.1.1. Preparación del bioensayo	81
III.2.1.2. Análisis de las microplacas	82
III.2.1.3. Análisis estadístico de los resultados	83
III.2.2. Optimización de Bioensayo “BT” para la detección de tetraciclinas en leche.	84
III.2.3. Optimización de Bioensayo “BS” para la detección de sulfamidas en leche	86
III.2.4. Estudio de detección del Sistema Microbiológico en microplaca 1 (SMmp1)	87
III.3. Diseño, optimización y validación del SMmp2 (<i>G. stearothermophilus</i> , <i>B. cereus</i> y <i>B. subtilis</i>).	90
III.3.1. Diseño de Bioensayo “B” (<i>G. stearothermophilus</i>) para la detección de betalactámicos en leche	90
III.3.1.1. Efecto del tiempo de incubación y concentración de esporas sobre la respuesta de Bioensayo “B” específico para betalactámicos.	90
III.3.2. Diseño de Bioensayo “T” (<i>B. cereus</i>) para la detección de tetraciclinas en la leche.	95
III.3.2.1. Efecto de la concentración de esporas sobre el límite de detección de tetraciclina en leche y el tiempo de respuesta.	95
III.3.2.2. Estudio de factores de diseño sobre la respuesta de Bioensayo “T” (<i>B. cereus</i>)	96
III.3.2.3. Optimización de Bioensayo “T” mediante análisis de superficie de respuesta	98
III.3.3. Diseño del Bioensayo “S” (<i>B. subtilis</i>) para la detección de sulfamidas en la leche	102
III.3.3.1. Efecto de la concentración de esporas sobre el límite de detección de sulfatiazol en leche y el tiempo de respuesta	102
III.3.3.2. Estudio de factores de diseño sobre la respuesta de Bioensayo “S” (<i>B. subtilis</i>)	103
III.3.3.3. Efecto de la concentración de sobre los trimetoprim límites de detección de sulfamidas en leche para Bioensayo “S” (<i>B. subtilis</i>)	105
III.3.4. Estudio de detección del Sistema Microbiológico en microplaca 2 (SMmp2)	106
III.4. Estrategias analíticas para una mejor detección e identificación de residuos de antibióticos en la leche	110
IV. Resultados	111
IV. 1. Resultados del diseño y la optimización del SMmp1	111
IV.1.1. Diseño robusto de un bioensayo para la detección de penicilina en leche	111
IV.1.2. Resultados de la optimización del Bioensayo “BT” para la detección de tetraciclinas en leche	118

IV.1.2.1. Selectividad del bioensayo “BT” para detección de tetraciclinas en leche	118
IV.1.2.2. Límites de detección de tetraciclinas en leche analizadas con Bioensayo “BT” .	119
IV.1.3. Resultados de la optimización de Bioensayo “BS” para la detección de sulfamidas en leche.	123
IV.1.3.1. Selectividad del Bioensayo “BS” para la detección de sulfamidas en leche	124
IV.1.3.2. Límites de detección de sulfamidas en leche analizadas con Bioensayo “BS” . .	125
IV.1.3.2.1. Curvas dosis-respuesta de sulfamidas en leche para Bioensayo “BS” elaborado sin TMP	125
IV.1.3.2.2. Curvas dosis-respuesta de sulfamidas en leche para Bioensayo “BS” elaborado con TMP	127
IV.1.4. Resultados del Sistema Microbiológico en microplaca 1 (SMmp1)	132
IV.1.4.1. Límites de detección de antibióticos betalactámicos en leche para el SMmp1 .	132
IV.1.4.1.2. Límites de detección de sulfamidas en leche para el SMmp1	139
IV.1.4.1.3. Límites de detección de tetraciclinas en leche para el SMmp1	143
IV.1.4.1.4. Límites de detección de otros agentes antimicrobianos en leche para el SMmp1	146
IV.1.4.2. Interpretación de los resultados conjuntos de Bioensayos “BT” y “BS”	155
IV.2. Diseño y optimización del Sistema Microbiológico en Microplaca2 (SMmp2).	158
IV.2.1. Diseño de Bioensayo “B” (<i>G. stearothermophilus</i>) para la detección de betalactámicos en leche	158
IV.2.1.1. Efecto de concentración de esporas y tiempo de incubación sobre la respuesta de Bioensayo “B” para antibióticos betalactámicos.	158
IV.2.1.2. Efecto de concentración de esporas y tiempo de incubación sobre la respuesta de Bioensayo “B” para tetraciclinas	169
IV.2.1.3. Optimización de concentración de esporas y tiempo de incubación mediante la función deseabilidad.	177
IV.2.2. Diseño de Bioensayo “T” (<i>B. cereus</i>) para la detección de tetraciclinas en leche .	180
IV.2.2.1. Efecto de la concentración de esporas sobre el límite de detección de la tetraciclina en leche y el tiempo de respuesta de Bioensayo “T”	180
IV.2.2.2. Efecto de los principales factores que afectan a la respuesta de Bioensayo “T”	184
IV.2.2.3. Optimización de Bioensayo “T” (<i>B. cereus</i>) mediante un diseño según la matriz de Doherlet	186
IV.2.2.4. Optimización de concentración de esporas y tiempo de incubación mediante la función deseabilidad	192
IV.2.3. Diseño de Bioensayo “S” (<i>B. subtilis</i>) para la detección de sulfamidas en leche. .	195
IV.2.3.1. Efecto de la concentración de esporas sobre el límite de detección de las sulfamidas en leche y el tiempo de respuesta de Bioensayo “S”	195
IV.2.3.2. Efecto de los principales factores que afectan a la respuesta de Bioensayo “S” .	199
IV.2.3.3. Optimización de Bioensayo “S” (<i>B. subtilis</i>) para la detección de sulfamidas en leche	200
IV.2.3.3.1. Estudio de selectividad de Bioensayo “S” para la detección de sulfamidas en leche	201
IV.2.3.3.2. Efecto del trimetoprim en el Bioensayo “S” sobre los límites de detección de sulfamidas en leche	202

IV.2.4. Resultados de detección del Sistema Microbiológico en Microplaca 2 (SMmp2) . .	208
IV.2.4.1. Límites de detección de antibióticos betalactámicos en leche con el SMmp2 . .	208
IV.2.4.2. Límites de detección de tetraciclinas en leche con el SMmp2	216
IV.2.4.3. Límites de detección de sulfamidas en leche con el SMmp2	220
IV.2.4.4. Límites de detección de otros antimicrobianos en leche con el SMmp2	224
IV.2.4.5. Interpretación simultánea de los resultados obtenidos mediante el SMmp2	233
IV.3. Estrategias analíticas para una adecuada detección e identificación de residuos de antibióticos en la leche	236
IV.3.1. Estrategia analítica para una mejor “detección” de residuos de antibióticos en la leche	236
IV.3.2. Estrategia analítica para una mejor “identificación” de residuos de antibióticos en la leche	241
V. Conclusiones	247
VI. Bibliografía	250

Índice de Tablas

Tabla I.1	Clasificación de las sustancias antimicrobianas.	4
Tabla I.2	Consumo de antimicrobianos en medicina veterinaria a nivel mundial . . .	9
Tabla I.3	Antibióticos utilizados en el tratamiento de patologías del ganado vacuno diferentes a la mastitis en España	14
Tabla I.4	Presencia de residuos de antibióticos en leche en diferentes países.	17
Tabla I.5	Frecuencias de residuos y contaminantes en leche de la República Argentina	20
Tabla I.6	Límites máximos de residuos (LMRs) establecidos por el Codex Alimentarius, Unión Europea y niveles de tolerancia en USA de antimicrobianos en leche	26
Tabla I.7	Técnicas analíticas autorizadas por SENASA en Argentina para la detección de residuos de antibióticos en la leche	31
Tabla I.8	Principales bioensayos microbiológicos para la detección de residuos de antibióticos en la leche	34
Tabla I.9	Características de los principales métodos rápidos para la detección de residuos de antibióticos en la leche	37
Tabla I.10	Propiedades a evaluar para la validación de diferentes métodos analíticos.	40
Tabla I.11	Límites de detección ($\mu\text{g/l}$) de sustancias antimicrobianas suministrados por los fabricantes de los métodos microbiológicos.	43
Tabla I.12	Límites de detección ($\mu\text{g/l}$) de sustancias antimicrobianas suministrados por los fabricantes de los métodos rápidos	47
Tabla I.13	Características de los principales Sistemas Microbiológicos Multiplaca utilizados para la detección e identificación de residuos de antibióticos en carne	55
Tabla I.14	Características del Sistema Microbiológico Multiplaca (SMMP) propuesto por Nouws et al (1999 _{a,b})	62
Tabla I.15	Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del SMMP propuesto por Nouws et al (1999 _{a,b})	63
Tabla I.16	Características del Sistema Microbiológico Multiplaca propuesto por Fuselier y Maris (1999).	64
Tabla I.17	Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del SMMP propuesto por Fuselier y Maris (1999).	64
Tabla I.18	Características del Sistema Microbiológico Multiplaca (SMMP) propuesto por Tsai y Kondo (2001).	65
Tabla I.19	Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del SMMP propuesto por Tsai y Kondo (2001)	66
Tabla III.1	Condiciones de esporulación y pasteurización de las bacterias-test.	74
Tabla III.2	Composición de los medios de cultivos y características de elaboración de los bioensayos que componen a SMmp1 y SMmp2.	75
Tabla III.3	Antibióticos utilizados en el diseño y validación de los bioensayos	77
Tabla III.4	Indicadores utilizados en los SMmp y colores clasificados según sus respuestas.	80
Tabla III.5	Niveles de los diferentes factores empleados en el diseño experimental.	81

Tabla III.6	Matriz del Diseño Experimental Robusto $2^3 \times 2^2$	82
Tabla III.7	Concentraciones de tetraciclinas utilizadas para la optimización de Bioensayo "BT"	85
Tabla III.8	Concentraciones de sulfamidas utilizadas para la optimización de Bioensayo "BS"	87
Tabla III.9	Concentraciones de antibióticos betalactámicos utilizados para el cálculo de los límites de detección de SMmp1	88
Tabla III.10	Concentraciones de tetraciclinas y sulfamidas utilizadas para el cálculo de los límites de detección de SMmp1	88
Tabla III.11	Concentraciones de otros agentes antimicrobianos utilizados para el cálculo de los límites de detección de SMmp1	89
Tabla III.12	Concentraciones de betalactámicos y tetraciclinas utilizadas para la optimización de Bioensayo "B" (<i>G. stearothermophilus</i>)	91
Tabla III.13	Niveles de los factores empleados en el diseño factorial fraccionado para optimización de Bioensayo "T" (<i>B. cereus</i>)	97
Tabla III.14	Matriz del diseño factorial fraccionado $2^{(6-3)}$ utilizado para la optimización de Bioensayo "T" (<i>B. cereus</i>)	97
Tabla III.15	Matriz del diseño Doehlert utilizada para la optimización del Bioensayo "T" (<i>B. cereus</i>)	100
Tabla III.16	Concentraciones tetraciclinas utilizadas para la optimización del Bioensayo "T" (<i>B. cereus</i>) mediante un diseño Doehlert	101
Tabla III.17	Niveles de los factores empleados en el diseño factorial fraccionado para optimización de Bioensayo "S" (<i>B. subtilis</i>)	104
Tabla III.18	Matriz del diseño factorial fraccionado $2^{(4-1)}$ utilizada para la optimización de Bioensayo "S" (<i>B. subtilis</i>)	104
Tabla III.19	Concentraciones de sulfamidas utilizadas en el estudio de los límites de detección de Bioensayo "S"	105
Tabla III.20	Concentraciones de antibióticos utilizadas para la determinación de los límites de detección de Bioensayo "B" (<i>G. stearothermophilus</i>)	107
Tabla III.21	Concentraciones de antibióticos utilizadas para la determinación de los límites de detección de Bioensayo "T" (<i>B. cereus</i>)	108
Tabla III.22	Concentraciones de antibióticos utilizadas para la determinación de los límites de detección de Bioensayo "S" (<i>B. subtilis</i>)	109
Tabla IV.1	Nivel de significación de los efectos principales y sus interacciones dobles sobre la respuesta del bioensayo	111
Tabla IV.2	Límites de detección de penicilinas calculados con el modelo robusto de regresión logística para diferentes factores de control y de ruido	113
Tabla IV.3	Efectos de los niveles de CAP sobre la selectividad del bioensayo	119
Tabla IV.4	Valores de χ^2 y probabilidad para los diferentes factores que afectan la respuesta de los bioensayos elaborados con CAP para la detección de tetraciclinas	120
Tabla IV.5	Ecuaciones logísticas de las curvas dosis-respuestas de las tetraciclinas para los bioensayos preparados con diferentes niveles de "CAP"	121
Tabla IV.6	Efecto de la concentración de CAP en el bioensayo sobre los límites de detección de tetraciclinas en leche	123

Tabla IV.7	Efecto de la concentración de “TMP” en el medio de cultivo sobre la selectividad de los bioensayos	125
Tabla IV.8	Ecuaciones logísticas de las curvas dosis-respuestas de sulfamidas para el bioensayo sin TMP en el medio de cultivo	126
Tabla IV.9	Límites de detección de sulfamidas en leche calculados para el bioensayo sin TMP en el medio de cultivo	127
Tabla IV.10	Valores de χ^2 y probabilidad para los diferentes factores contemplados en el modelo logístico interactivo en el bioensayo para SAs	128
Tabla IV.11	Ecuaciones logísticas de las curvas dosis-respuestas de las sulfamidas para los bioensayos preparados con diferentes niveles de TMP	129
Tabla IV.12	Efecto de las concentraciones de TMP sobre los límites de detección de SAs en leche	129
Tabla IV.13	Ecuaciones logísticas de las curvas dosis respuestas de betalactámicos en leche analizadas con el Bioensayo “BT”	132
Tabla IV.14	Ecuaciones logísticas de las curvas dosis respuestas de betalactámicos en leche analizadas con el Bioensayo “BS”	133
Tabla IV.15	Límites de detección de betalactámicos en leche para el SMmp1	136
Tabla IV.16	Ecuaciones logísticas de las curvas dosis respuestas de sulfamidas en leche analizadas con Bioensayo “BT”	139
Tabla IV.17	Ecuaciones logísticas de las curvas dosis respuestas de sulfamidas analizadas con Bioensayo “BS”.	140
Tabla IV.18	Límites de detección de sulfamidas en leche para el SMmp1	142
Tabla IV.19	Ecuaciones logísticas de las curvas dosis respuestas de tetraciclinas en leche analizadas con Bioensayo “BT”	143
Tabla IV.20	Ecuaciones logísticas de las curvas dosis respuestas de tetraciclinas en leche analizadas con Bioensayo “BS”	144
Tabla IV.21	Límites de detección de tetraciclinas en leche para el SMmp1	145
Tabla IV.22	Ecuaciones logísticas de las curvas dosis respuestas de aminoglucósidos, macrólidos y quinolonas en leche analizadas con Bioensayo “BT”	146
Tabla IV.23	Ecuaciones logísticas de las curvas dosis respuestas de aminoglucósidos, macrólidos y quinolonas en leche analizadas con Bioensayo “BS”	147
Tabla IV.24	Límites de detección de aminoglucósidos, macrólidos y quinolonas en leche para el SMmp1.	153
Tabla IV.25	Detección simultánea de antimicrobianos en la leche mediante Bioensayos “BT” y “BS”	156
Tabla IV.26	Interpretación de los resultados mediante la aplicación simultánea de Bioensayos “BT” y “BS”	157
Tabla IV.27	Parámetros estadísticos calculados mediante el modelo logístico en la optimización de Bioensayo “B” (<i>G. stearothermophilus</i>) para la detección de betalactámicos en leche	159
Tabla IV.28	Ecuaciones logísticas de las curvas dosis-respuesta de betalactámicos en leche analizadas mediante Bioensayo “B” (<i>G. stearothermophilus</i>)	160
Tabla IV.29	Efectos de la concentración de esporas y tiempo de incubación sobre los límites de detección de penicilinas en leche mediante Bioensayo “B” (<i>G. stearothermophilus</i>)	168

Tabla IV.30	Parámetros estadísticos calculados mediante el modelo logístico en la optimización de Bioensayo “B” (<i>G. stearothermophilus</i>) para las tetraciclinas en leche	170
Tabla IV.31	Ecuaciones logísticas de las curvas dosis-respuesta de tetraciclinas en leche analizadas mediante Bioensayo “B” (<i>G. stearothermophilus</i>)	171
Tabla IV.32	Efectos de la concentración de esporas y tiempo de incubación sobre los límites de detección de tetraciclinas en leche mediante Bioensayo “B” (<i>G. stearothermophilus</i>)	177
Tabla IV.33	Criterios utilizados para la optimización de Bioensayo “B” mediante la función deseabilidad	178
Tabla IV.34	Valores de deseabilidades parciales y límites de detección calculados para la optimización de Bioensayo “B”	178
Tabla IV.35	Efecto de Log[E] sobre los límites de detección de tetraciclina en leche y el tiempo de respuesta para Bioensayo “T” (<i>B. cereus</i>)	182
Tabla IV.36	Parámetros estadísticos del diseño factorial fraccionado utilizado en la optimización de Bioensayo “T” (<i>B. cereus</i>)	184
Tabla IV.37	Efectos de CAP y Log[E] sobre la selectividad de Bioensayo “T”	186
Tabla IV.38	Parámetros estadísticos obtenidos mediante la aplicación del modelo de regresión logística en la optimización de Bioensayo “T” (<i>B. cereus</i>) mediante un diseño de matriz de Doehlert	187
Tabla IV.39	Ecuaciones logísticas de las curvas dosis-respuesta de tetraciclinas en leche analizadas mediante Bioensayo “T” (<i>B. cereus</i>)	188
Tabla IV.40	Efectos de la concentración de esporas y tiempo de incubación sobre los límites de detección de tetraciclinas en leche mediante Bioensayo “T” (<i>B. cereus</i>)	192
Tabla IV.41	Criterios utilizados para la optimización de Bioensayo “T” mediante la función deseabilidad	193
Tabla IV.42	Valores de deseabilidad específicos y límites de detección calculados para la optimización de Bioensayo “T”	193
Tabla IV.43	Efecto de Log [E] sobre los límites de detección de STZ en leche y el tiempo de respuesta para Bioensayo “S” (<i>B. subtilis</i>)	197
Tabla IV.44	Parámetros estadísticos del diseño factorial fraccionado utilizado en la optimización de Bioensayo “S” (<i>B. subtilis</i>)	199
Tabla IV.45	Efecto de la concentración de TMP en el medio de cultivo sobre la selectividad de Bioensayo “S”	201
Tabla IV.46	Modelos logísticos que representan las curvas dosis-respuestas de sulfamidas para Bioensayo “S” (<i>B. subtilis</i>) sin TMP	202
Tabla IV.47	Límites de detección de sulfamidas en leche calculados para Bioensayo “S” (<i>B. subtilis</i>) sin TMP	203
Tabla IV.48	Valores de χ^2 y probabilidad de los factores contemplados en el modelo logístico para Bioensayo “S” (<i>B. subtilis</i>) utilizado para detectar sulfamidas en leche	204
Tabla IV.49	Modelos logísticos que representan el efecto del TMP sobre las curvas dosis-respuestas de las sulfamidas en leche para Bioensayo “S” (<i>B. subtilis</i>)	204
Tabla IV.50	Efecto del TMP sobre los límites de detección de sulfamidas en leche para Bioensayo “S” (<i>B. subtilis</i>)	208

Tabla IV.51	Modelos logísticos de las curvas dosis de los antibióticos betalactámicos en leche analizados con Bioensayo “B” (<i>G. stearothermophilus</i>)	209
Tabla IV.52	Modelos logísticos de las curvas dosis de los antibióticos betalactámicos en leche analizados con Bioensayo “T” (<i>B. cereus</i>)	209
Tabla IV.53	Modelos logísticos de las curvas dosis de los antibióticos betalactámicos en leche analizados con Bioensayo “S” (<i>B. subtilis</i>)	210
Tabla IV.54	Límites de detección de antibióticos betalactámicos en leche para SMmp2	214
Tabla IV.55	Modelos logísticos de las curvas dosis-respuestas de tetraciclinas en leche analizados con Bioensayo “B” (<i>G. stearothermophilus</i>)	216
Tabla IV.56	Modelos logísticos de las curvas dosis-respuestas de tetraciclinas en leche analizados con Bioensayo “T” (<i>B. cereus</i>)	216
Tabla IV.57	Modelos logísticos de las curvas dosis-respuestas de tetraciclinas en leche analizados con Bioensayo “S” (<i>B. subtilis</i>)	217
Tabla IV.58	Límites de detección de tetraciclinas en leche para el SMmp2	219
Tabla IV.59	Modelos logísticos de las curvas dosis-respuestas de sulfamidas en leche analizados con Bioensayo “B” (<i>G. stearothermophilus</i>)	220
Tabla IV.60	Modelos logísticos de las curvas dosis-respuestas de sulfamidas en leche analizados con Bioensayo “T” (<i>B. cereus</i>)	221
Tabla IV.61	Modelos logísticos de las curvas dosis-respuestas de sulfamidas en leche analizados con Bioensayo “S” (<i>B. subtilis</i>)	221
Tabla IV.62	Límites de detección de sulfamidas el leche para el SMmp2	224
Tabla IV.63	Modelos logísticos de las curvas dosis-respuestas de otros agentes antimicrobianos en leche analizados con Bioensayo “B” (<i>G. stearothermophilus</i>)	225
Tabla IV.64	Modelos logísticos de las curvas dosis-respuestas de otros agentes antimicrobianos en leche analizados con Bioensayo “T” (<i>B. cereus</i>)	226
Tabla IV.65	Modelos logísticos de las curvas dosis-respuestas de otros agentes antimicrobianos en leche analizados con Bioensayo “S” (<i>B. subtilis</i>)	227
Tabla IV.66	Límites de detección de otros antimicrobianos en leche para el SMmp2	231
Tabla IV.67	Antimicrobianos detectados mediante el SMmp2	234
Tabla IV.68	Interpretación de los resultados obtenidos con el SMmp2	235
Tabla IV.69	Interpretación de los resultados obtenidos mediante la aplicación simultánea de Bioensayos “BT”, “BS” y “S”	242
Tabla IV.70	Interpretación de los resultados obtenidos mediante la aplicación simultánea de Bioensayos “B”, “T”, “S” y “BS”	244

Índice de Figuras

Figura I.1	Frecuencia de tratamientos de patologías del ganado vacuno que emplean sustancias antimicrobianas.	8
Figura I.2	Frecuencias de antibióticos utilizados en formulaciones farmacéuticas de productos veterinarios para el tratamiento de la mastitis.	10
Figura I.3	Frecuencia de antibióticos utilizados en los tratamientos intramamarios en vacas en lactación de España durante el año 2006	11
Figura I.4	Frecuencia de antibióticos utilizados en los tratamientos inyectables en vacas en lactación de España durante el año 2006	12
Figura I.5	Frecuencia de antibióticos utilizados en los tratamientos inyectables en vacas en período de secado de España durante el año 2006	13
Figura I.6	Frecuencias relativas de las causas más frecuentes de la presencia de residuos en la leche	18
Figura I.7	Distribución porcentual de muestras positivas en España determinadas por el Sistema Microbiológico Multiplaca	20
Figura I.8	Sistema integrado de control de residuos de antibióticos y sulfamidas en la leche	29
Figura III.1	Efecto de los pesos sobre la función deseabilidad para la maximización o minimización de variables repuestas.	94
Figura III.2	Esquema del diseño Doehlert para el estudio de dos factores.	99
Figura IV.1	Efectos del volumen del medio de cultivo y la concentración de esporas sobre las curvas dosis-respuesta de la penicilina en leche.	115
Figura IV.2	Efectos del volumen de medio de cultivo y el tiempo de incubación sobre las curvas dosis-respuesta de la penicilina en leche.	116
Figura IV.3	Efectos de la concentración de esporas y del tiempo de incubación sobre las curvas dosis-respuestas de la penicilina en leche.	117
Figura IV.4	Curvas dosis-respuesta de las tetraciclinas para diferentes concentraciones de cloranfenicol en el medio de cultivo	122
Figura IV.5	Curvas dosis-respuesta de las sulfamidas en leche para el bioensayo sin la adición de TMP en el medio de cultivo	126
Figura IV.6	Curvas dosis-respuesta de las sulfamidas en leche para diferentes niveles de TMP en el medio de cultivo	130
Figura IV.7	Curvas dosis respuestas de penicilinas en leche analizadas con Bioensayo "BT"	134
Figura IV.8	Curvas dosis respuestas de cefalosporinas de leche analizadas con Bioensayo "BT"	134
Figura IV.9	Curvas dosis respuestas de penicilinas en leche analizadas con Bioensayo "BS"	135
Figura IV.10	Curvas dosis respuestas de cefalosporinas de leche analizadas con Bioensayo "BS"	135
Figura IV.11	Curvas dosis respuestas de sulfamidas en leche analizadas con Bioensayo "BT"	141
Figura IV.12	Curvas dosis respuestas de sulfamidas en leche analizadas con Bioensayo "BS"	141
Figura IV.13	Curvas dosis respuestas de tetraciclinas de leche analizadas con Bioensayo "BT"	144

Figura IV.14	Curvas dosis respuestas de tetraciclinas de leche analizadas con Bioensayo "BS"	145
Figura IV.15	Curvas dosis respuestas de aminoglucósidos en leche analizadas con Bioensayo "BT"	148
Figura IV.16	Curvas dosis respuestas de aminoglucósidos en leche analizadas con Bioensayo "BS"	148
Figura IV.17	Curvas dosis respuestas de macrólidos en leche analizadas con Bioensayo "BT"	149
Figura IV.18	Curvas dosis respuestas de macrólidos en leche analizadas con Bioensayo "BS"	150
Figura IV.19	Curvas dosis respuestas de quinolonas en leche analizadas con Bioensayo "BT"	151
Figura IV.20	Curvas dosis respuestas de quinolonas en leche analizadas con Bioensayo "BS"	152
Figura IV.21	Efectos de concentración de esporas y tiempo de incubación sobre la curva dosis-respuesta de ampicilina en leche analizada mediante Bioensayo "B" (<i>G. stearothermophilus</i>)	161
Figura IV.22	Efectos de concentración de esporas y tiempo de incubación sobre la curva dosis-respuesta de cloxacilina en leche analizada mediante Bioensayo "B" (<i>G. stearothermophilus</i>)	162
Figura IV.23	Efectos de concentración de esporas y tiempo de incubación sobre la curva dosis-respuesta de oxacilina en leche analizada mediante Bioensayo "B" (<i>G. stearothermophilus</i>)	163
Figura IV.24	Efectos de concentración de esporas y tiempo de incubación sobre la curva dosis-respuesta de penicilina en leche analizada mediante Bioensayo "B" (<i>G. stearothermophilus</i>)	164
Figura IV.25	Superficies de respuestas que muestran los efectos de la concentración de esporas y tiempo de incubación sobre los límites de detección de Bioensayo "B" (<i>G. stearothermophilus</i>)	166
Figura IV.25 (cont.)	Superficies de respuestas que muestran los efectos de la concentración de esporas y tiempo de incubación sobre los límites de detección de Bioensayo "B" (<i>G. stearothermophilus</i>)	167
Figura IV.26	Efectos de la concentración de esporas y tiempo de incubación sobre la curva dosis-respuesta de clortetraciclina en leche analizada mediante Bioensayo "B" (<i>G. stearothermophilus</i>)	172
Figura IV.27	Efectos de la concentración de esporas y tiempo de incubación sobre la curva dosis-respuesta de oxitetraciclina en leche analizada mediante Bioensayo "B" (<i>G. stearothermophilus</i>)	173
Figura IV.28	Efectos de la concentración de esporas y tiempo de incubación sobre la curva dosis-respuesta de tetraciclina en leche analizada mediante Bioensayo "B" (<i>G. stearothermophilus</i>)	174
Figura IV.29	Superficies de respuestas que muestran los efectos de la concentración de esporas y tiempo de incubación sobre los límites de detección de tetraciclinas de Bioensayo "B" (<i>G. stearothermophilus</i>)	175
Figura IV.29 (cont.)	Superficies de respuestas que muestran los efectos de la concentración de esporas y tiempo de incubación sobre los límites de detección de tetraciclinas de Bioensayo "B" (<i>G. stearothermophilus</i>)	176
Figura IV.30	Efectos de Logaritmo de esporas y Tiempo de incubación sobre la deseabilidad global para Bioensayo "B" (<i>G. stearothermophilus</i>)	180

Figura IV.31	Efecto de la concentración de esporas sobre la curva dosis-respuesta de tetraciclina en leche analizadas mediante Bioensayo "B" (<i>B. cereus</i>).	181
Figura IV.32	Efecto de la concentración de esporas sobre los límites de detección de tetraciclina en leche utilizando Bioensayo "T" (<i>B. cereus</i>)	182
Figura IV.33	Efecto de la concentración de esporas sobre el tiempo de respuesta de Bioensayo "T" (<i>B. cereus</i>) utilizado para la detección de tetraciclina en leche	183
Figura IV.34	Efecto de la concentración de esporas y CAP sobre la curva dosis-respuesta de tetraciclina en leche analizada con Bioensayo "T" (<i>B. cereus</i>)	185
Figura IV.35	Efecto del logaritmo de la concentración de esporas y CAP sobre la curva dosis-respuesta de tetraciclinas en leche analizada con Bioensayo "T" (<i>B. cereus</i>)	190
Figura IV.36	Superficies de respuestas que muestran los efectos de la concentración de esporas y CAP sobre los límites de detección de tetraciclinas de Bioensayo "T" (<i>B. cereus</i>)	191
Figura IV.37	Efectos de la concentración de esporas y cloranfenicol sobre la deseabilidad global para Bioensayo "T" (<i>B. cereus</i>)	194
Figura IV.38	Efecto de la concentración de esporas sobre la curva dosis-respuesta de sulfatiazol en leche analizadas mediante Bioensayo "S" (<i>B. subtilis</i>).	196
Figura IV.39	Efecto de la concentración de esporas sobre los límites de detección de sulfatiazol en leche utilizando Bioensayo "S" (<i>B. subtilis</i>).	197
Figura IV.40	Efecto de la concentración de esporas sobre el tiempo de respuesta de Bioensayo "S" (<i>B. subtilis</i>) utilizado para la detección de sulfamidas en leche.	198
Figura IV.41	Efecto de la concentración de TMP sobre la curva dosis-respuesta de sulfatiazol en leche analizada con Bioensayo "S" (<i>B. subtilis</i>)	200
Figura IV.42	Curvas dosis-respuesta de las sulfamidas en leche para Bioensayo (<i>B. subtilis</i>) sin la adición de TMP	203
Figura IV.43	Efecto del TMP sobre las curvas dosis-respuesta de las sulfamidas en leche para Bioensayo "S" (<i>B. subtilis</i>)	206
Figura IV.43	Efecto del TMP sobre las curvas dosis-respuesta de las sulfamidas en leche para Bioensayo "S" (<i>B. subtilis</i>)	207
(cont.)		
Figura IV.44	Curvas dosis respuestas de penicilinas en leche analizadas con Bioensayo "B"	211
Figura IV.45	Curvas dosis respuestas de cefalosporinas de leche analizadas con Bioensayo "B"	211
Figura IV.46	Curvas dosis respuestas de penicilinas en leche analizadas con Bioensayo "T"	212
Figura IV.47	Curvas dosis respuestas de cefalosporinas de leche analizadas con Bioensayo "T"	212
Figura IV.48	Curvas dosis respuestas de penicilinas en leche analizadas con Bioensayo "S"	213
Figura IV.49	Curvas dosis respuestas de cefalosporinas de leche analizadas con Bioensayo "S"	213
Figura IV.50	Curvas dosis-respuesta de tetraciclinas en leche analizadas con Bioensayo "B"	218

Figura IV.51	Curvas dosis-respuesta de tetraciclinas en leche analizadas con Bioensayo "T"	218
Figura IV.52	Curvas dosis-respuesta de tetraciclinas en leche analizadas con Bioensayo "S"	219
Figura IV.53	Curvas dosis-respuesta de las sulfamidas en leche analizadas con Bioensayo "B"	222
Figura IV.54	Curvas dosis-respuesta de las sulfamidas en leche analizadas con Bioensayo "T"	222
Figura IV.55	Curvas dosis-respuesta de las sulfamidas en leche analizadas con Bioensayo "S"	223
Figura IV.56	Curvas dosis respuestas de aminoglucósidos en leche analizadas con Bioensayo "B"	228
Figura IV.57	Curvas dosis respuestas de macrólidos en leche analizadas con Bioensayo "B"	228
Figura IV.58	Curvas dosis respuestas de quinolonas en leche analizadas con Bioensayo "B"	228
Figura IV.59	Curvas dosis respuestas de aminoglucósidos en leche analizadas con Bioensayo "T"	229
Figura IV.60	Curvas dosis respuestas de macrólidos en leche analizadas con Bioensayo "T"	229
Figura IV.61	Curvas dosis respuestas de quinolonas en leche analizadas con Bioensayo "T"	229
Figura IV.62	Curvas dosis respuestas de aminoglucósidos en leche analizadas con Bioensayo "S"	230
Figura IV.63	Curvas dosis respuestas de macrólidos en leche analizadas con Bioensayo "S"	230
Figura IV.64	Curvas dosis respuestas de quinolonas en leche analizadas con Bioensayo "S"	230
Figura IV.65	Perfil de detección de SMmp1 y SMmp2	237
Figura IV.66	Perfil de detección para Bioensayo "BT" y Bioensayo "S"	240

Introducción

I. INTRODUCCIÓN

I.1. MEDICAMENTOS UTILIZADOS EN EL TRATAMIENTO DEL GANADO VACUNO

I.1.1. CONSIDERACIONES PREVIAS

El amplio uso de los medicamentos veterinarios y específicamente aquellos de tipo anti-infecciosos tales como los antibióticos y sulfamidas, representa una práctica muy frecuente en la cría y explotación del ganado vacuno, necesaria para el mantenimiento de un nivel productivo económicamente rentable.

Además, en los países más desarrollados, se advierte una gran evolución de las explotaciones ganaderas hacia sistemas de producción más industrializados, acompañados de un incremento en el número de animales en espacios cada vez más reducidos. Esta situación trae aparejado mayores riesgos en la aparición de enfermedades del ganado. Por todo ello, a fin de evitar pérdidas económica, se recurre al empleo de sustancias farmacológicas (Debackere, 1995).

Entre las sustancias más difundidas en los tratamientos veterinarios, se deben destacar a los agentes antimicrobianos, que se definen, de forma general, como productos que son capaces de destruir o inhibir el crecimiento de los microorganismos, siendo además efectivos a bajas concentraciones (Mateos, 2002). A diferencia de la medicina humana, el empleo de antimicrobianos en animales productores de alimentos, entre los cuales se destaca el ganado vacuno, ha tenido dos finalidades principales, por un lado la prevención y el control de infecciones microbianas, y por otro, su uso como promotores del crecimiento.

Debido a la enorme preocupación en la población que ocasiona la aparición de microorganismos resistentes a ciertas sustancias antimicrobianas, las recomendaciones de la Unión Europea (UE) sobre el uso prudente de estos agentes antimicrobianos en medicina humana (CEE, 2002b), ha tenido consecuencias directas sobre el empleo de estos productos en el área de la sanidad animal.

En Argentina, el control de xenobióticos en la leche está a cargo Servicio Nacional de Seguridad Alimentaria (SENASA, 1999) y sigue las directrices de CODEX Alimentarius, fijando los Límites Máximos Admisibles de residuos y contaminantes en los alimentos.

A continuación se realizará una revisión sobre los diferentes tipos de antibióticos, clasificación y usos, así como las frecuencias de aparición en el ganado vacuno productor de leche.

1.1.2. CLASIFICACIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LAS SUSTANCIAS ANTIMICROBIANAS

Los antimicrobianos son sustancias que proceden de diferentes microorganismos o se sintetizan químicamente, con capacidad de inhibir o destruir los procesos vitales de las bacterias. Estas sustancias empleadas en dosis terapéuticas - bajas concentraciones- para el tratamiento de infecciones, no presentan efectos tóxicos graves sobre el hospedador infectado, pero sí para los microorganismos (Domínguez y Moreno, 2001).

Rang *et al.* (2000) destacan que la elección de un agente antimicrobiano para ser utilizado en el tratamiento de cierta enfermedad infecciosa, debe cumplir una serie de requisitos que se pueden resumir en:

- Elevada actividad antimicrobiana, eficaz y selectiva; y que no se reduzca por la biotransformación que sufra en el cuerpo,
- Características farmacocinéticas adecuadas, de modo tal que proporcionen elevados niveles en los lugares de acción y permanencia durante tiempos prolongados,
- Baja toxicidad para el huésped.
- No debe generar resistencias bacterianas.
- Eficacia por vía tópica, oral o parenteral.
- Alta penetrabilidad.
- Estable, no lábil.
- Fácil de producir en grandes cantidades y a bajo coste.

De todo ello, se deduce que resulta prácticamente imposible encontrar una sustancia antimicrobiana que reúna todas las características mencionadas anteriormente, motivo por el cual, generalmente se recurre a combinaciones de antimicrobianos para mejorar la efectividad de los tratamientos. Sin embargo, no todas las combinaciones de estas sustancias alcanzan a ser viables, debido a la incompatibilidad química de sus estructuras (Löscher, 1994).

Aunque los antimicrobianos son moléculas que obedecen a una amplia clase de compuestos, a menudo se los clasifican en diferentes grupos. Las múltiples clasificaciones existentes presentan diferentes características y han sido realizadas basándose en distintos criterios. Por tal motivo, resulta difícil establecer que una

clasificación sea más adecuada que otra. Actualmente, el sistema más utilizado por la comunidad científica es el que agrupa a estos compuestos por su similitud química, según los núcleos base de sus estructuras, que les confieren cierta semejanza en sus propiedades físico-químicas y farmacológicas.

En la Tabla I.1. se muestra una clasificación de los agentes antimicrobianos según su estructura química, realizada a partir de un estudio llevado a cabo por diferentes autores (Prescott *et al.*, 2002; Adams, 2003; Merck & CO, 2003). En dicha Tabla se presentan los grupos de antibióticos betalactámicos, aminoglucósidos, macrólidos, tetraciclinas y quinolonas, así como el grupo quimioterapéutico de las sulfonamidas y otros agentes antimicrobianos, considerándose además las diferentes moléculas que los componen.

En la actualidad, los antibióticos betalactámicos constituyen uno de los grupos más amplios e importantes, empleados en Medicina Veterinaria. Estos antibióticos fueron los primeros en descubrirse (penicilina) y su estructura base es el anillo betalactámico. Existen dos grandes grupos que se diferencian químicamente: las penicilinas y las cefalosporinas. Se trata de un grupo de antibióticos especialmente utilizado en la terapia y profilaxis de la mastitis del ganado lechero. Hay que destacar que en los últimos años, se ha avanzado mucho en el desarrollo de nuevas sustancias, tales como los inhibidores de la beta-lactamasa, las carbapemas y los monobactámicos (Adams, 2003).

Hay que señalar además que, el consumo de antibióticos betalactámicos -solos o combinados-, casi se ha triplicado como consecuencia de la comercialización de algunas moléculas concretas: amoxicilina-clavulánico, cefalexina, ceftiofur y cefquinoma, puesto que han desplazado a la asociación clásica “penicilina-estreptomicina” de gran éxito terapéutico (Marco *et al.*, 2001).

De todos los betalactámicos, la más utilizada es la penicilina que se emplea en la terapia de enfermedades infecciosas y en mayor medida para controlar la mastitis bovina, en forma de preparados intramamarios principalmente, y para el tratamiento de infecciones de los sistemas gastrointestinal, urinario y respiratorio del ganado vacuno lechero (Botsoglou y Fletouris, 2001).

Las cefalosporinas se utilizan fundamentalmente en preparaciones intramamarias para el tratamiento de las mastitis durante el secado y la lactación. Además se emplean en el tratamiento intrauterino de la metritis y el tratamiento parenteral de infecciones en ganado vacuno, ovino, caprino y porcino (Botsoglou y Fletouris, 2001).

Tabla I.1. Clasificación de las sustancias antimicrobianas

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

Elaboración propia a partir de Prescott *et al.* (2002), Adams (2003) y Merck & CO (2003).

Con respecto a los antibióticos aminoglucósidos (gentamicina, kanamicina, neomicina, espictomicina, etc.), se debe destacar que, en general, se usan en el tratamiento de una gran variedad de infecciones entéricas, respiratorias y otras infecciones causadas por gérmenes “gram negativos” como la colibacilosis y salmonelosis de terneros y cerdos (Adams, 2003). También, los aminoglucósidos se emplean solos o en combinación con otros antimicrobianos (betalactámicos, tetraciclinas o macrólidos) para el tratamiento de la mastitis, metritis y enfermedades de tipo respiratorias (Botsoglou y Fletouris, 2001; Prescott *et al.*, 2002).

El grupo de los macrólidos, está constituido por un conjunto de compuestos estructuralmente emparentados. Los miembros del grupo incluyen principalmente a la eritromicina, tilosina, carbomicina, espiramicina y lincomicina, entre otros. Las indicaciones generales de estos antibióticos abarcan infecciones de las vías respiratorias superiores, bronconeumonías, enteritis bacterianas, metritis, piodermatitis, infecciones urinarias, artritis y otras.

En la actualidad, otro grupo importante de antimicrobianos son las quinolonas (ácido nalidíxico, flumequina, sarafloxacin) y las fluoroquinolonas (enrofloxacin, ciprofloxacina, ofloxacina, levofloxacina, etc.). Se trata de un grupo farmacológico de mayor desarrollo en estos momentos y su uso en medicina veterinaria se ha incrementado enormemente en los últimos diez años. Estos compuestos se emplean cada vez más en clínica veterinaria bovina para tratar las enteritis neonatales y enfermedades respiratorias, en algunos casos, para el tratamiento sistémico de las mastitis colibacilar (Busani *et al.*, 2003).

Las tetraciclinas son los antibióticos más utilizados en medicina veterinaria, debido a su amplio espectro de acción que inhibe el crecimiento de una extensa variedad de bacilos y cocos “gram positivos” y bacilos “gram negativos” (*Brucella*, *Legionella pneumophyla*, *Helicobacter pilory*, *Borrelia recurrentis*), también presentan actividad sobre *Rickettsia*, *Mycoplasma*, *Chlamydia* y *Espiroquetas* (Cinquina *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2004). Se utilizan principalmente para tratar infecciones sistémicas en ganado lechero como enteritis bacterianas, metritis, mastitis, etc. y locales como la queratoconjuntivitis infecciosa y clamidiasis, entre otras enfermedades.

Con respecto a las sulfamidas, su acción antimicrobiana se basa en la inhibición de las bacterias “gram negativas” y “gram positivas”, algunas *Clamidias*, *Nocardia*, *Actinomyces spp*, y algunos protozoos. Las más activas pueden actuar frente varias especies de *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Salmonella*, *Pasteurella* e incluso *Escherichia coli*. Se utilizan normalmente para tratar o evitar enfermedades

sistémicas o locales, entre las cuales se destacan la coccidiosis, mastitis, metritis, colibacilosis, poliartritis, infecciones respiratorias y toxoplasmosis. Por lo general se administran en preparados comerciales con trimetoprim, por presentar un efecto sinérgico potenciador de la acción antimicrobiana (Hitchings, 1973; Prescott *et al.*, 2002; Adams, 2003).

Por último, existen otros compuestos que no se engloban en ninguno de los grupos mencionados anteriormente pero son importantes a nivel de los productores. Entre ellos se destacan los antibióticos glucopeptídicos, especialmente la vancomicina con acción bactericida eficaz frente a bacterias “gram positivas”, los antibióticos polimixinas donde la polimixina B y la colistina son las dos sustancias de principal uso con efecto bactericida rápido y selectivo en bacilos “gram negativos” y la bacitrina, antibiótico polipeptídico muy activo frente a microorganismos “gram positivos”.

1.1.3. USO DE ANTIBIÓTICOS EN TRATAMIENTOS DEL GANADO VACUNO PRODUCTOR DE LECHE

Actualmente, las principales enfermedades infecciosas del ganado vacuno son mastitis, metritis, neumonías, enteritis y cojeras (Zwald *et al.*, 2004; Sawant *et al.*, 2005). Para el tratamiento de estas patologías, es frecuente el uso de medicamentos veterinarios antimicrobianos.

En el caso del ganado vacuno productor de leche, la mastitis es una de las patologías más frecuentes y conlleva mayores pérdidas económicas y gasto veterinario (Gruet *et al.*, 2001; Sawant *et al.*, 2005).

No es extraño por lo tanto, que la mayor parte de los residuos de sustancias antibacterianas detectadas en la leche, procedan de los tratamientos terapéuticos relacionados con la glándula mamaria (hasta un 90% de los casos), ya sea por los tratamientos ligados a mamitis clínicas, o por las terapias preventivas que se emplean en el período de secado (Fabre *et al.*, 1995; Erskine *et al.*, 2003).

En efecto, Miller (1995) destaca que las sustancias utilizadas en el tratamiento de las enfermedades infecciosas de la ubre del ganado lechero, principalmente mastitis, son muy frecuentes de encontrar en la leche.

El impacto de las mastitis ha dado lugar al desarrollo de diversas estrategias terapéuticas para controlar las infecciones. Así, se utilizaron numerosos productos con fines terapéuticos y/o profilácticos (antimicrobianos, antiinflamatorios, vacunas,

vitaminas, citoquinas, homeopatía) y se ensayaron distintas rutas de administración, tales como sistémica, intramamaria o aplicación local (Gruet *et al.*, 2001).

En el tratamiento de las denominadas “mastitis clínicas” se utilizan preparados de actuación y eliminación rápida, mientras que en los procesos de las “mastitis subclínicas” se emplean preparados de acción y eliminación lenta, también conocidos como “tratamientos de secado”, porque se aplican, en general, durante la fase seca de la lactación de la vaca para evitar la contaminación de la leche.

Estos últimos tratamientos (“de secado”) pueden ser más peligrosos, puesto que una aplicación por error a una vaca que se encuentra en su lactación, puede ocasionar una contaminación de la leche durante períodos de 4 a 8 semanas.

En cuanto a las vías de administración, los tratamientos veterinarios que originan una mayor frecuencia de residuos en la leche son aquellos de tipo intramamario, por aplicarse directamente en la glándula mamaria, objeto de dicha administración. Estos tratamientos, si bien logran una elevada eficacia terapéutica por su acción local, por el otro lado, producen una mayor excreción del antibiótico con la leche procedente de los animales tratados.

Entre los antibióticos más frecuentemente utilizados se destacan los betalactámicos (penicilinas y cefalosporinas) por ser eficaces contra los microorganismos patógenos que causan mastitis (*Estafilococos* y *Estreptococos*).

Además, los denominados “partos adelantados” constituyen un potencial riesgo que puede presentarse durante los “tratamientos de secado”. En efecto, cuando una vaca tratada durante su fase de secado adelanta su parto y, no se respeta un tiempo mínimo de 8 semanas desde la aplicación del antibiótico, la leche puede contener residuos procedentes del tratamiento. Por ello, el productor debe registrar la fecha de aplicación, la fecha de parto y calcular el tiempo transcurrido entre aplicación del tratamiento y el parto estimado.

En todos los casos, tanto en los tratamientos empleados en el período de secado mediante preparados de eliminación lenta, así como en los tratamientos de animales en etapa de lactación con preparados de eliminación rápida resulta necesario el respeto de los “periodos de seguridad” y el “control en el tambo”, a fin de garantizar que la leche esté libre de residuos a niveles superiores a los Límites Máximos de Residuos (LMRs).

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

En resumen, los antimicrobianos se pueden utilizar en las mastitis en dos fases del ciclo productivo. En una primera etapa, para tratar vacas en lactación con problemas de mastitis clínicas o subclínicas y en una segunda etapa para reducir las infecciones subclínicas durante el periodo de secado y de este modo aumentar la vida productiva del animal (Gruet *et al.*, 2001; Erskine *et al.*, 2003). En cualquier caso, la terapia más adecuada debe basarse en el conocimiento previo de la etiología de la infección (Méndez *et al.*, 1999).

Con respecto a otros tratamientos del ganado vacuno, se debe destacar que después de la mastitis (que representa el 85% de las patologías), son frecuentes las metritis y las afecciones podales (Zwald *et al.*, 2004; Sawant *et al.*, 2005), aunque tampoco se debe subestimar las neumonías, diarreas, eczemas, furunculosis, etc. Para el tratamiento las cojeras y las metritis de naturaleza infecciosa se indican asociaciones de penicilinas y estreptomicina, cefalosporinas de 1^a, 2^a y 3^a generación, oxitetraciclina, macrólidos y sulfonamidas (Veterindustria, 2006).

Un estudio llevado a cabo en Suiza (Diserens *et al.* 2005) durante el período comprendido entre los años 2003 y 2004, señala que el 74.6% de los tratamientos fueron de tipo intramamario (44.2 % durante el secado y 30.4 % para la mastitis), mientras que los tratamientos en el parto (10.0 %), tracto digestivo (5.5%), pezones (1.5%) y pulmones (1.3%) son menos frecuentes, según se muestra en la Figura I.1.

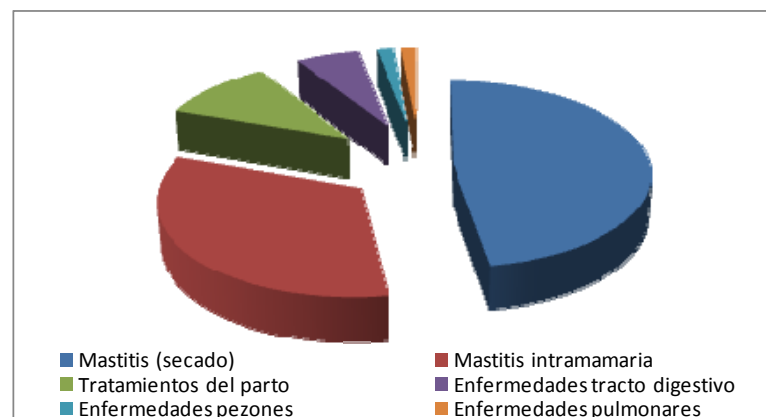


Figura I.1. Frecuencia de tratamientos de patologías del ganado vacuno que emplean sustancias antimicrobianas (Diserens *et al.*, 2005).

Hay que señalar que algunos productores no respetan las pautas establecidas en el manejo de los medicamentos, especialmente en lo que se refiere a tiempo de espera, dosis de administración, frecuencias, etc. Como consecuencia de ello, pueden aparecer residuos de estos medicamentos en la leche a niveles superiores a los LMRs ocasionando problemas para la salud pública y la industria agroalimentaria.

I.1.4. FRECUENCIA DE ANTIMICROBIANOS EMPLEADOS EN EL GANADO VACUNO LECHERO

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

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

Por todos estos motivos, la recopilación y procesamiento de datos sobre consumo y/o distribución de antimicrobianos en el área de la sanidad animal a nivel mundial es una tarea difícil. Los datos oficiales más actualizados que se dispone en la Unión Europea (IFAH-Europa, 2006) han sido seleccionados en base a un estudio ponderado de los distintos principios activos empleados en sanidad animal en el periodo comprendido entre los años 1997 y 1999, y se exponen en la Tabla I.2.

Tabla I.2. Consumo de antimicrobianos en medicina veterinaria a nivel mundial

Antimicrobianos	Distribución (%)
Betalactámicos	9
Tetraciclinas	66
Macrólidos	12
Aminoglucósidos	4
Fluoroquinolonas	1
Sulfonamidas/trimetoprim	2
Otros	6

IFAH-Europa (2006).

Se observa que los antibióticos betalactámicos (9%) unidos a las tetraciclinas (66%) y los macrólidos (12%) representan juntos el 86% de del uso terapéutico total de antimicrobianos en el sector veterinario, seguidos en una menor proporción por los aminoglucósidos (4%), sulfonamidas (2%) y fluoroquinolonas (1%).

Según Gruet *et al.* (2001), el número de sustancias disponibles en Europa para el tratamiento de mastitis no es muy elevado, ya que la mayor parte de los principios activos comerciales se encuentran incluidos en el grupo de los betalactámicos o se trata de combinaciones de éstos con algún macrólido, quinolona o aminoglucósido.

Al respecto, Diserens *et al.* (2005) realizan un estudio sobre el uso de antibióticos en vacas lactantes durante los tratamientos de mastitis y secado, que comprende 629 formulaciones en 23 países de la CEE. La Figura I.2. presenta la frecuencia de los antibióticos más empleados en las formulaciones farmacéuticas. Se observa que del total de productos farmacéuticos estudiados, las moléculas más utilizadas son cloxacilina (32.7%), penicilina (23.4%), ampicilina (15.6%), neomicina (14.9%), seguidas en menor importancia por dihidroestreptomicina (9.5%), cefalexina (5.1%), lincomisina (4.3%) y en menores proporciones amoxicilina, cefapirina y cefoperazone.

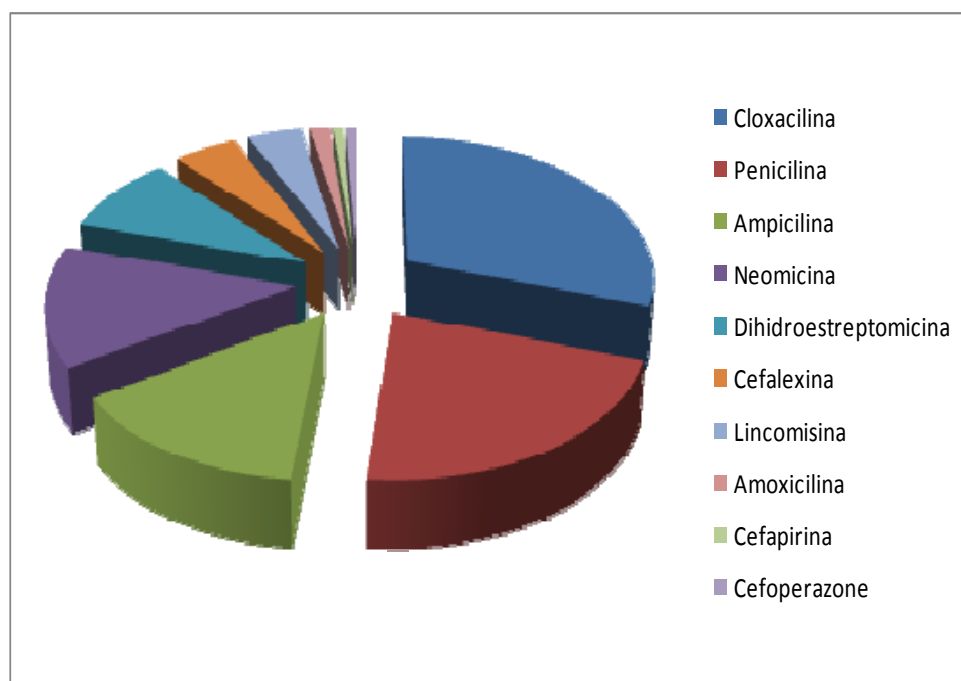


Figura I.2. Frecuencias de antibióticos utilizados en formulaciones farmacéuticas de productos veterinarios para el tratamiento de la mastitis (Diserens *et al.*, 2005).

En España, para el caso concreto de la mastitis, Zorraquino *et al.* (2007) elaboraron un estudio para el Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino antes Ministerio Agricultura, Pesca y Alimentación, donde se calcularon las frecuencias de utilización de antibióticos en los tratamientos antimamarios durante el año 2006, basándose en los preparados vendidos durante ese año por los laboratorios asociados a Veterindustria y encuestas efectuadas a un 25% de las explotaciones de vacuno lechero (6.618 explotaciones), que representan el 11% del censo vacuno de leche en España.

El mencionado trabajo revela que, en los tratamientos intramamarios en vacas en lactación, los antibióticos betalactámicos (39% penicilinas y 11% cefalosporinas) son las moléculas más empleadas contra la mastitis, seguidos por los aminoglucósidos (34%) y en menor proporción las tetraciclinas, sulfamidas, macrólidos, etc.

Con respecto a las moléculas más empleadas en los tratamientos intramamarios son neomicina (34.5%), penicilina (25.1%), estreptomina (23.8%), ampicilina (18.3%), amoxicilina (16.9%), kanamicina (15.9%), ácido clavulánico (15.3%), cefalexina (14.5%), gentamicina (11.4%), dicloxacilina (10.5%), cloxacilina (9.5%), cefoperazona (6.0%) y cefquinoma (5.4%), tal como se expone en Figura I.3.

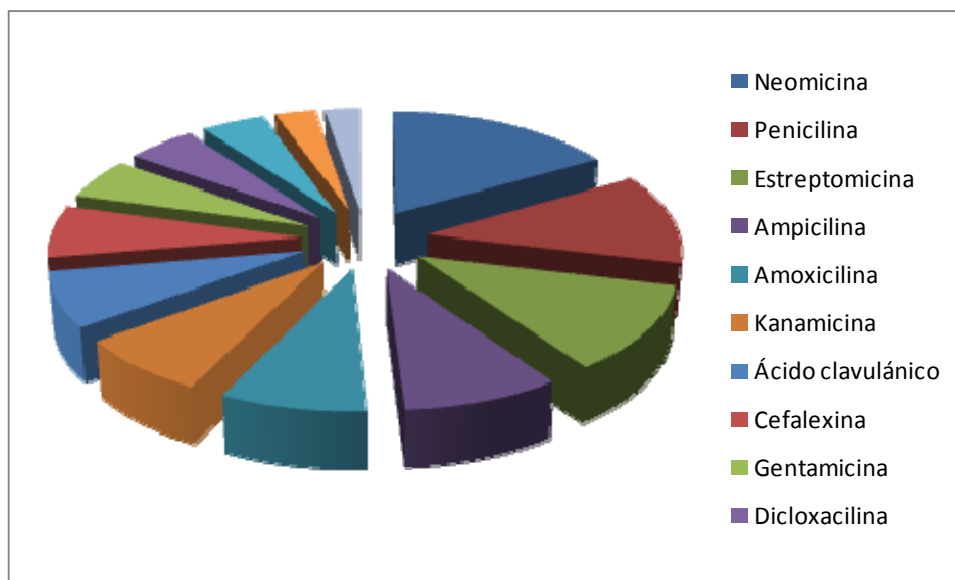


Figura I.3. Frecuencia de antibióticos utilizados en los tratamientos intramamarios en vacas en lactación de España durante el año 2006 (Zorraquino *et al.*, 2007).

Para los tratamientos por vía parenteral (inyectables) de la mastitis de vacas durante el período de lactación, los datos del análisis de las encuestas realizadas por Zorraquino *et al.* (2007) destacan que las moléculas de mayor uso (Figura I.4) son

penicilina (43.1%), enrofloxacina (17.3%), amoxicilina (12.1%), cefquinoma (7.7%) y ácido clavulánico (7.3%), seguido en menor importancia por gentamicina (5.8%), estreptomicina (4.4%) y espiramicina (3.4%).

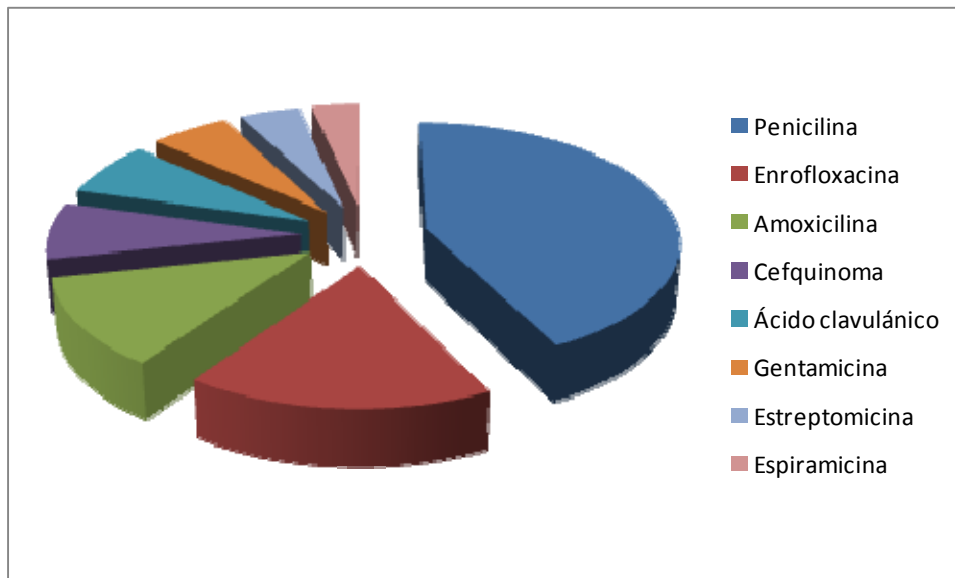


Figura I.4. Frecuencia de antibióticos utilizados en los tratamientos inyectables en vacas en lactación de España durante el año 2006 (Zorraquino *et al.*, 2007).

Con respecto a la fase del secado, dichos autores señalan que los antibióticos más utilizados en la forma intramamaria (Figura I.5) corresponden a penicilina (62.4%), cloxacilina (32.6%), neomicina (27.1%), cefalonio (18.2%), ampicilina (3.0%), cefquinoma (2.4%), cefapirina (2.3%) y cefalexina (2.3%).

Además, Zorraquino *et al.* (2007) realizan un análisis de riesgos teniendo en cuenta las frecuencias de los diferentes tratamientos (70% para intramamario, 20 % para secado y 10% para inyectable) y factores de ponderación específicos para cada molécula según las prescripciones excepcionales (“extra-label use”) por parte del veterinario o no autorizado (“off-label use”) por parte del productor. Los riesgos relativos son 61% para betalactámicos, 27% para aminoglucósidos, 3% para colistina, 2% para quinolonas, sulfamidas y trimetoprim y 1% para novobiocina y tetraciclinas. Destacan finalmente que, se respetan en un 85% los períodos de seguridad cuando se emplean medicamentos de uso autorizado. El riesgo de contaminación de la leche con residuos de antibióticos provienen del uso de medicamentos “extra-label”, del uso “poco prudente” por parte del veterinario, o como una consecuencia del “mal uso” o uso “no autorizado” por parte del productor.

Con respecto a los antibióticos utilizados para el tratamiento de otras patologías del ganado vacuno, diferentes a la mastitis (Tabla I.3), Zorraquino (2008)

señalan que las frecuencias más importantes se deben a la metritis (22.7%), infecciones podales (15.5%), neumonías (15.3%) y heridas postquirúrgicas (9.5%) principalmente.

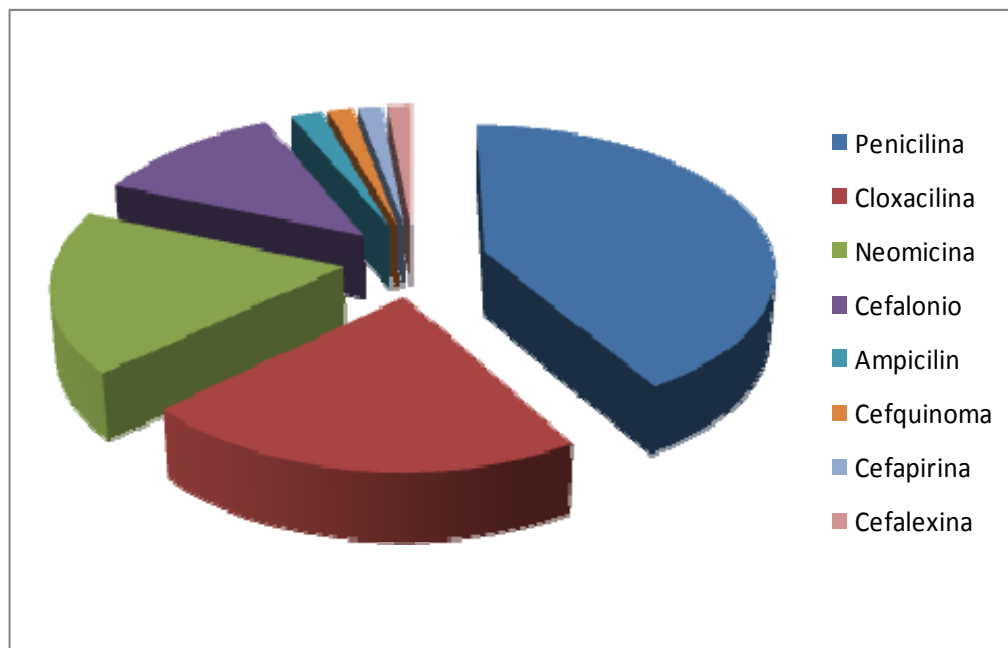


Figura 1.5. Frecuencia de antibióticos utilizados en los tratamientos inyectables en vacas en período de secado de España durante el año 2006 (Zorraquino *et al.*, 2007).

Entre los diferentes antibióticos empleados (Tabla 1.3, Zorraquino, 2008), se destacan la penicilina para el tratamiento de metritis (23.0%) y heridas postquirúrgicas (65%); la oxitetraciclina para la metritis (37.0%) y neumonías (28.4%); el ceftiofur en caso de metritis (27.0%) e infecciones podales (22.0%); la cefalexina (29.3%) y tilosina (20.7%) para el tratamiento de las infecciones podales y la enrofloxacina (23.3%) para otras infecciones del ganado vacuno productor de leche.

A modo de síntesis, se puede establecer haciendo uso de las Figura 1.2 a Figura 1.5 y la Tabla 1.3. que los antibióticos que se emplean con mayor frecuencia en los medicamentos para diferentes tipos de tratamientos del ganado vacuno en España son penicilinas (penicilina, cloxacilina, amoxicilina, ampicilina), cefalosporinas (cefalexina, cefquinoma, cefalonio, cefapirina), aminoglucósidos (neomicina, gentamicina, kanamicina y estreptomisina, aunque este último se emplea combinado con penicilina), quinolonas (enrofloxacina), tetraciclinas (oxitetraciclina) y en menor medida espiramicina y lincomisina.

Tabla I.3. Antibióticos utilizados en el tratamiento de patologías del ganado vacuno diferentes a la mastitis en España

Antibióticos	Metritis (22.7%)	Infecciones Podales (15.5 %)	Neumonias (15.3 %)	Heridas postquirúrgicas (9.5 %)	Otras Infecciones (10.3 %)
Oxitetraciclina	37.0 %	10.0 %	28.4 %	15.2 %	2.8 %
Penicilina	23.0 %	9.2 %	8.5 %	65.0 %	6.6 %
Ceftiofur	27.0 %	22.0 %	15.6 %	8.0 %	2.3 %
Cefapirina	14.0 %	-	-	-	-
Cefquinoma	2.9 %	-	3.5 %	-	-
Cefalexina	-	29.3 %	6.5 %	6.2 %	-
Tilosina	-	20.7 %	2.4 %	-	-
Enrofloxacina	-	-	4.2 %	6.0 %	23.3 %
Amoxicilina	-	-	9.1 %	-	3.6 %
Ampicilina	-	-	-	-	4.0 %
Marbofloxacina	-	-	8.5 %	-	4.5 %
Sulfamidas TMP	-	-	-	-	24.3 %
Gentamicina	-	-	3.7 %	-	10.3 %
Colistina	-	-	2.4 %	-	8.9 %

Fuente: Zorraquino (2008). Relevamiento de 2.747 explotaciones ganaderas de España (118.775 vacas lecheras, 12% del censo español).

I.2. RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS EN LA LECHE

I.2.1. ORIGEN DE LOS RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS EN LA LECHE

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

La mayor parte de los fármacos se distribuyen casi inmediatamente en todo el organismo, especialmente si se administran por vía intravenosa. En otros casos, el desplazamiento del medicamento en el organismo obedece a leyes físico-químicas y bioquímicas específicas (Sumano y Ocampo, 1997; Adams, 2003).

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

La eliminación en el organismo de la forma activa del medicamento depende esencialmente de los procesos de biotransformación y excreción, aunque también de otros factores, entre los que destacan el volumen de distribución y la unión del fármaco a proteínas plasmáticas (Rang *et al.*, 2000; Prescott *et al.*, 2002).

En orden de importancia, las vías de excreción de los medicamentos son renal, biliar, pulmonar, mamaria, salival, secreciones gastrointestinales través de la piel y vía genital. Existen una serie de factores inherentes a la aplicación de los antibióticos que pueden influir en la calidad y en la duración de los tiempos de excreción y por lo tanto en su presencia en la leche (Debackere, 1995). La excreción de los agentes antimicrobianos a través de la leche depende de una serie de factores fisico-químicos, como pH, solubilidad del fármaco en lípidos y unión de éste a las proteínas. A su vez, estos factores pueden verse alterados por la enfermedad y provocar cambios sistémicos o locales en la distribución de cada sustancia (Saran, 1995).

Además de todos los factores mencionados anteriormente, uno de los aspectos más importantes que condiciona la cantidad de residuos presente en la leche es el tiempo transcurrido entre el cese de la administración de las sustancias antibacterianas y la recolección de la leche. De este modo, la cantidad de residuos es mayor en aquellos casos en los que dicho periodo no es lo suficientemente largo para permitir la eliminación total de los residuos del organismo animal (Botsoglou y Fletouris, 1996).

Se define con el nombre de “tiempo de espera” o “tiempo de retiro” de un antibiótico, al periodo que debe transcurrir tras la última aplicación del medicamento y el aprovechamiento de la leche obtenida del animal tratado. Este tiempo de espera constituye una característica esencial y específica del medicamento para cada tipo de producto (carne, leche, huevos, etc.). El respeto del tiempo de retirada es necesario para evitar la presencia de residuos en los alimentos a niveles superiores a los LMR establecidos para cada medicamento y producto.

Por todo ello, se deben utilizar únicamente los medicamentos que han sido sometidos a comisiones de evaluación. En la CEE, la Comisión Europea de Evaluación se encarga de controlar y evaluar que los medicamentos estén debidamente registrados y autorizados para su comercialización y utilización. Además, se establece que resulta necesario respetar las condiciones de utilización de acuerdo con las dosis recomendadas por el fabricante y mantener los tiempos de espera que se especifican en el medicamento para dichas dosis.

En Argentina, la presidencia del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA, 2009), mediante la resolución 63/2009 señala que “*Los productos veterinarios nacionales o importados destinados a ser utilizados en animales productores de alimentos para consumo humano, con fines de promoción de su crecimiento y que contengan en su formulación antibióticos y/o quimioterápicos, distintos de los coccidiostáticos e histomonostáticos, deberán incluir en sus rótulos, de manera claramente visible, la siguiente leyenda: Este producto no debe administrarse con fines de promoción de crecimiento, a animales productores de alimentos para consumo humano, cuyos productos y/o subproductos, incluidos leches, huevos y miel, se exporten a la Unión Europea y/o a otros países con requisitos equivalentes*”.

Por todo ello, y debido a la diversa cantidad de factores que afectan a la eliminación de los antibióticos y/o sus metabolitos en la leche, se desprende que los datos de frecuencia de uso de cada antimicrobiano no resulta adecuado para estimar su frecuencia de aparición en la leche. Al respecto, deben realizarse estudios cualitativos y cuantitativos que permitan determinar las frecuencias de inhibidores y de moléculas específicas de cada antibiótico en la leche.

1.2.2. EVOLUCIÓN DE LA FRECUENCIA DE RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS EN LA LECHE

La Tabla I.4. resume los principales trabajos que analizan la frecuencia de la presencia de residuos de antibióticos en la leche. Según los estudios realizados por Zorraquino *et al.* (2007), la incidencia de residuos de antibióticos en la leche ha disminuido en los últimos años, debido fundamentalmente a la implementación de las buenas prácticas ganaderas y los controles cada vez más frecuentes mediante el uso de métodos de screening.

Hace más de 20 años, la frecuencia de antibióticos en la leche alcanzaba al 11.1% de las muestras analizadas en el Reino Unido (Booth y Harding, 1986) y el 7-15% de los Estados Unidos (Jones y Seymour, 1988), disminuyendo hasta alcanzar porcentajes muy bajos como el 0.053% (FDA, 2003) y el 0.044% (Dalton, 2006).

Alemania, por su parte, también experimentó una disminución en la frecuencia de residuos de antibióticos en la medida que se incrementaron los controles con métodos microbiológicos de screening, desde un 2.8% en el año 1993 (Suhren y Heeschen, 1994) hasta un 0.23-0.31% en el año 2002 (Suhren y Walte, 2003), para reducirse aún más (0.04%) en los últimos años (Kress *et al.*, 2007).

Tabla I.4. Presencia de residuos de antibióticos en la leche en diferentes países

Año	País	Frecuencia	Referencia
1960	EEUU	5.2-6%	Albright <i>et al.</i> (1961); Seymour <i>et al.</i> (1988)
1960	Reino Unido	5%	Seymour <i>et al.</i> (1988)
1961	Reino Unido	11.1%	Booth y Harding (1986)
1975	EEUU	7-15%	Jones y Seymour (1988)
1984/85	Reino Unido	0.4%	Booth y Harding (1986)
1988	EEUU (Virginia)	0.06-0.2%	Jones y Seymour (1988)
1999/00	EEUU(New Cork)	0.039%	Van Schaik <i>et al.</i> (2002)
1993	Alemania	2.8%	Suhren y Heeschen (1994)
1994	EEUU	0.05-0.06%	Sischo (1996); Saville <i>et al.</i> (2000)
1995	EEUU	0.1%	Anderson <i>et al.</i> (1998); Dalton (2006)
1996	Portugal (Lisboa)*	44%	Marques Fontes <i>et al.</i> (1996)
1997	EEUU	0.1%	Saville <i>et al.</i> (2000)
1995/98	EEUU (Wisconsin)	0.03%	Rueg y Tabone (2000)
1998/02	Alemania	0.23-0.31%	Suhren y Walte (2003)
1999 [†]	Caribe	8-15%	Baynes <i>et al.</i> (1999)
2000	España (Andalucía)	0.18%	Sánchez <i>et al.</i> (2001)
2001	Italia (Brescia)	0.34%	Ghidini <i>et al.</i> (2003)
2003	EEUU	0.053%	FDA (2003)
2003	Bélgica	0.11%	FAVV (2003)
2004	Holanda	0.04%	MCS (2004)
2004	EEUU	0.044%	Dalton (2006)
2004 [†]	Kenia	8-15%	Shitandi y Sternejo (2004)
2005	Alemania (Bavaria)	0.04%	Kress <i>et al.</i> (2007)

*leches comerciales analizada por HPLC; [†]áreas no sometidas a control regulado; Referencia: Zorraquino *et al.* (2007).

Por el contrario, lugares donde se realizan menor número de controles de residuos de antibióticos en la leche, las frecuencias de aparición son más elevadas, como sucede en el Caribe (Baynes *et al.*, 1999) y Kenia (Shitandi y Sternejo, 2004), donde se reportan frecuencias comprendidas entre 8-15%.

Numerosos trabajos de la Tabla I.4 señalan que en un alto porcentaje estos residuos corresponden a antibióticos betalactámicos (Anderson *et al.*, 1998; Ghidini *et al.*, 2003; Dalton, 2006; Kress *et al.*, 2007), debido principalmente a que las penicilinas son los antibióticos más utilizados desde hace mucho tiempo (Ghidini *et al.*, 2003; Kress *et al.*, 2007) y al hecho que los métodos de screening empleados para su control, presentan mayor sensibilidad para la detección de betalactámicos que otros

antibióticos, como por ejemplo las quinolonas o los macrólidos (Linage *et al.*, 2007; Montero *et al.*, 2005; Althaus *et al.*, 2009).

1.2.3. PRINCIPALES ANTIBIÓTICOS DETECTADOS EN LA LECHE

Los trabajos de investigación llevados a cabo para analizar la distribución de residuos en la leche de los diferentes fármacos empleados en el tratamiento del ganado vacuno son muy limitados. Así, Fabre *et al.* (1995) realizaron un estudio donde se analizaron 1.018 granjas de vacunos productores de leche en Francia, con el propósito de identificar las posibles causas de la presencia de restos de inhibidores en la leche. Del total de explotaciones, 625 resultaron “granjas positivas”, de las cuales, en 516 de ellas fue posible identificar las causas que provocaron la presencia de residuos de inhibidores. Se concluye que, del total de muestras positivas al análisis de inhibidores, el 88% de los residuos proceden de los tratamientos relacionados con la mastitis (64%) y los tratamientos de secado (24%), mientras que un 11% se deben a tratamientos de patologías de la ubre. Por el contrario, otras posibles causas no relacionadas con la glándula mamaria representan solamente el 2% del total de los casos (Figura I.6).

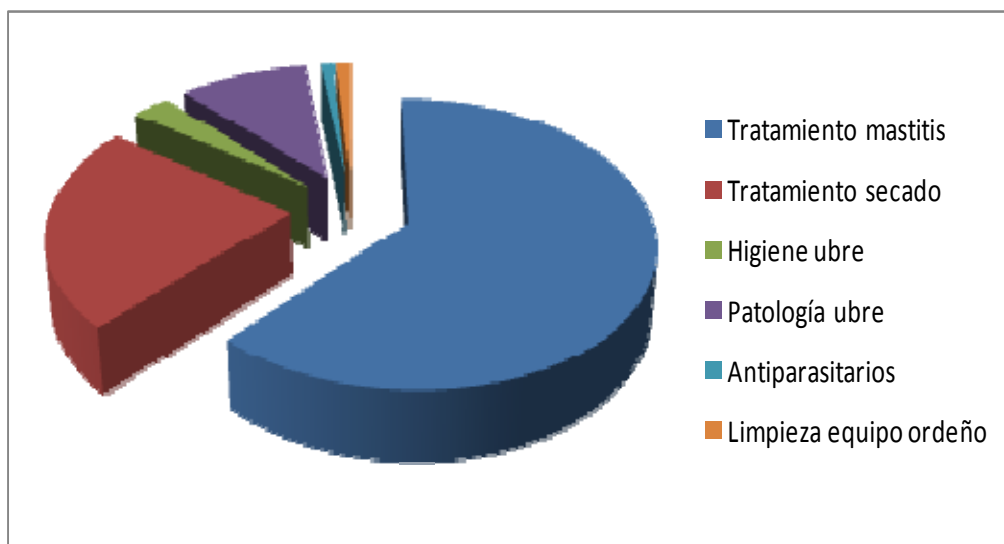


Figura I.6 Frecuencias relativas (%) de las causas más frecuentes de la presencia de residuos en la leche (n = 516). Fuente: Fabre *et al.* (1995).

El estudio realizado por Suhren y Walte (2003) en Alemania revela que de un total de 27394 cisternas analizadas, el 0.31% fueron positivas al método microbiológico BRT-AS y el 0.23% al método Devotest SP, de las cuales el 90.5% fueron confirmadas con la prueba de la “penicilinasa” como residuos de

betalactámicos. Por cromatografía se identificaron y cuantificaron los residuos de betalactámicos en el 82% de las muestras confirmadas anteriormente.

Además, se analizaron muestras de cisternas obtenidas en forma aleatorias para investigar grupos de antibióticos que no detectan los test de inhibidores empleados (BRT-AS y Delvotest). De 7977 cisternas analizadas mediante la bacteria-test *E. coli*, sólo una muestra señaló residuos de quinolonas (0.001%). De un total de 4472 cisternas analizados con un test ELISA específico para cloranfenicol, doce (0.27%) fueron positivas. Cuando se empleó un bioensayo que utiliza *Bacillus cereus* para la detección de tetraciclinas, de un total de 18428 cisternas analizadas, cinco (0.03%) resultaron positivas al método, mientras que el análisis de 1518 cisternas analizadas con un test ELISA específico para estreptomicina, señaló que 4 muestras (2.2%) fueron positivas (Suhren y Walte, 2003).

En España, el informe presentado por Zorraquino *et al.* (2007), señala que de un total de 3000 cisternas analizadas durante el año 2000-2001 en la región norte de España mediante el Sistema Microbiológico Múltiplaca (SMMP) propuesto por Rikilt-dlo, un 17% de cisternas fueron “positivos”.

Las frecuencias de aparición de moléculas obtenidas en este estudio se exponen en la Figura I.7. Se observa en dicho gráfico que las frecuencias mas elevadas corresponden a residuos de antibióticos betalactámicos (48%), sulfamidas (19%), quinolonas y macrólidos (15%), seguidos en menor proporción por las tetraciclinas (8%), aminoglucósidos (5%) y novobiocina (4.5%). Aunque, se debe destacar que los resultados positivos no fueron confirmados mediante métodos físico-químicos (HPLC, cromatografía) de identificación inequívoca, motivo por el cual, resulta difícil establecer una identificación definitiva de estos residuos.

En Argentina, los estudios realizados por SENASA (2009) acerca de la presencia de residuos y contaminantes en muestras de leche se resumen en la Tabla I.5. Es de destacar los elevados porcentajes de aflatoxinas (40%), plaguicidas organoclorados (17.6%) y organofosforados (4%). Con respecto a las diferentes familias de antimicrobianos, solamente se han estudiado las sulfamidas, tetraciclinas y fenicoles, sin encontrar resultados positivos en este trabajo.

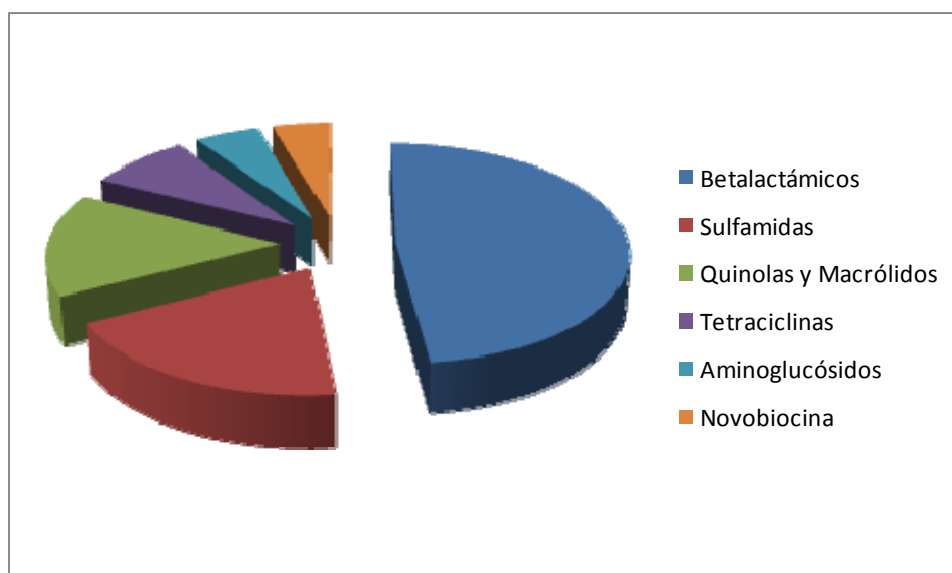


Figura I.7. Distribución porcentual de muestras positivas en España determinadas por el Sistema Microbiológico Multiplaca (citado por Zorraquino *et al.*, 2007).

Tabla I.5. Frecuencias de residuos y contaminantes en leche de la República Argentina

Residuo/Contaminante	Número de muestras	Frecuencia positivos (número positivos)
Tetraciclina	306	0
Sulfamidas	687	0
Fenicoles	328	0
Fenilbutazona	81	0
Benzoimidazoles	329	0
Endectocidas	327	0.6 (2)
Metabolitos nitrofuranos	151	0
Piretroides	327	0
Plaguicidas organoclorados	188	17.6 (33)
Plaguicidas organofosforados	175	4 (7)
Aflatoxina (M1)	215	40 (86)

Fuente: SENASA (2009).

1.2.4. EFECTOS DE LA PRESENCIA DE RESIDUOS DE MEDICAMENTOS

No hay duda que el uso de antibióticos en la terapia del ganado vacuno de leche ha mejorado significativamente su estado sanitario. Sin embargo, estos efectos positivos se contrarrestan con el hecho de que se pueden encontrar residuos de

medicamentos en la leche de los animales en lactación, incluso varios días después de terminar el tratamiento (Zorraquino, 1996; Honkanen-Buzalski y Reybroeck, 1997).

Si por alguna razón, esta leche que contiene antibióticos se introduce en el circuito lechero, puede contaminar eventualmente la leche almacenada en el tanque del tambo, en la cisterna de recolección o incluso en los grandes silos de almacenamiento en la industria (Zorraquino, 1997).

Por este motivo, dentro de los programas de control de calidad de la leche utilizada como materia prima para obtener productos alimentarios, se destinan apartados especiales que persiguen como objetivo controlar la presencia de residuos de sustancias antimicrobianas que influyen directamente sobre la calidad de la misma, tanto por su repercusión sanitaria como tecnológica. Tampoco se debe olvidar el factor económico que afecta considerablemente a los productores, debido a los descuentos o castigos que puedan llegar a percibir sobre el costo de la leche.

Desde el punto de vista de la salud pública, se conoce que los antibióticos pueden tener efectos adversos sobre la salud de los consumidores (Schwartz y Sher, 1984; Jones y Seymour, 1988; Dewney *et al.*, 1991; Moretain, 1996; Currie *et al.*, 1998; Cerniglia y Kotarski, 1999, Demoly y Romano, 2005). Entre los principales problemas que pueden ocasionar los antibióticos en los alimentos se destacan: sensibilización producida por una ingestión repetida de pequeñas dosis, procesos alérgicos que en casos extremos pueden producir anafilaxia, perturbaciones pasajeras en la flora intestinal, reacciones de intoxicación frente a determinados antibióticos.

De todos estos efectos, en la actualidad, el desarrollo de resistencias a los antimicrobianos representa la principal preocupación por parte de los consumidores (Tollefson y Karp, 2004). Resulta importante destacar que, algunas de las sustancias farmacológicas presentes en la leche resisten las altas temperaturas de los tratamientos industriales empleados en la pasteurización y esterilización de la leche. Por ello, pueden llegar al consumidor aún después de haberse tratado térmicamente en la industria (Jacquet y Auxepaules, 1978; Sullivan *et al.*, 1981; Oda y Hiwaki, 1996; Zorraquino, 2005; Roca, 2008; Zorraquino *et al.*, 2008a,b, 2009), hecho que agrava el problema para la salud pública.

En segundo lugar, se debe destacar los riesgos de tipo tecnológicos asociados a la presencia de residuos de antibióticos en la leche. En efecto, las bacterias empleadas en la fabricación de productos en la industria lechera se hallan entre las más sensibles a los antibióticos. Dichas bacterias, por efecto de los antibióticos, pueden presentar cambios morfológicos y situaciones donde los cultivos iniciadores

son reemplazados por microorganismos indeseables, provocando la inutilización del producto o el peligro para su consumo (Albrighth *et al.*, 1961).

Por ello, los procesos bacterianos utilizados en la elaboración de productos fermentados como queso y yogur se ralentizan, pudiendo retrasar la acidificación, dificultar el cuajado y la maduración (Mourot y Loussouarn, 1981; Brady y Katz, 1987, Goursand, 1991; 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 *et al.*, 2001).

Así, Del Prato (1997) observa problemas en la elaboración de productos fermentados, ya que el desarrollo del *Streptococcus salivarius* var. *thermophilus* utilizado en la elaboración del yogur se ve dificultado cuando están presentes concentraciones de 500-5000 µg/l de estreptomina, 50-100 µg/l de cloranfenicol o 1-10 µg/l de tetraciclina.

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

En tercer término, se debe tener presente que, los residuos de antibióticos en la leche ocasionan pérdidas económicas tanto para las empresas lácteas como para el productor que entrega leche contaminada.

Por su parte, el productor que entrega leche con residuos de antibióticos puede recibir penalizaciones en el precio por parte de la industria, llegando, dado la magnitud de la contaminación, al “no retiro” de la leche por parte de la industria o la “no comercialización”, al ser penalizada por parte de las autoridades sanitarias de la comercialización de la leche en Argentina (SENASA, 1999, 2000, 2001 y 2003) o en Europa (CEE, 2004a,b).

1.2.5. ASPECTOS LEGALES

En las últimas décadas, el concepto de calidad de la leche ha cobrado más importancia, debido especialmente a los grandes inconvenientes que puede llegar a producir la presencia de agentes antimicrobianos, tanto para la industria láctea como para el consumidor.

En efecto, en la leche pueden hallarse residuos de procedencia muy diversa, como herbicidas y plaguicidas -originados por los sistemas modernos de explotaciones agrarias-, antibióticos -provenientes del tratamiento de los animales con diferentes fármacos-, o desinfectantes y detergentes -ampliamente utilizados en las salas de ordeño-, entre otros.

El uso prudente de productos antimicrobianos en medicina veterinaria, debe servir para mantener la eficacia antibiótica de los productos y evitar que el ser humano se vea expuesto por vía alimentaria a la presencia de residuos y por lo tanto al desarrollo de organismos resistentes (Anthony *et al.*, 2001).

Para proteger a la salud pública, se han establecido los Límites Máximos de Residuos (LMRs) para los alimentos de origen animal, incluidos la carne, el pescado, la leche, los huevos y la miel.

1.2.5.1. Límites Máximos de Residuos de antibióticos en la leche

Para controlar la presencia de residuos de medicamentos en los alimentos, las diferentes legislaciones, como el Codex Alimentarius, la Unión Europea y en el Código Alimentario Argentino han establecido los Límites Máximos de Residuos (LMRs). Así, en la Unión Europea, el Grupo de trabajo de Seguridad de Residuos del Comité de Medicamentos Veterinarios (CVMP, del inglés Committee for Veterinary Medicinal Products) fijó los LMRs. El mecanismo por el cual se regula la determinación de los LMRs está legislado en el Reglamento 2377/90/CEE (CEE, 1990), donde se clasifican los principios activos de los medicamentos en los anexos I, II o III y IV.

El Anexo I incluye aquellas sustancias cuyos LMRs se han establecido para uno o más productos animales y en el Anexo II se encuentran aquellas que no es necesario establecer sus LMRs porque se consideran seguras. El Anexo III contempla las sustancias que tienen un LMR provisional (MRLP, pendiente de más estudios), mientras que el Anexo IV resume 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.

Este Reglamento define los residuos de medicamentos veterinarios como *“todas las sustancias farmacológicas activas, ya sean principios activos, excipientes o productos de degradación, y sus metabolitos que permanezcan en los productos*

alimenticios obtenidos a partir de animales a los que se les hubiere administrado el medicamento veterinario de que se trate”.

Además, en dicha reglamentación se define al Límite Máximo de Residuo (LMR) de Residuos Medicamentos Veterinarios (RMV) como: *“el contenido máximo (concentración) de residuos resultante de la utilización de un medicamento veterinario (expresado en mg/kg o g/kg sobre la base del peso en fresco) autorizada en la Comunidad o reconocida como admisible en un producto alimenticio”.*

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

En Argentina, por medio del DECRETO 815/1999 (SENASA, 1999) del Poder Ejecutivo Nacional se establece el Sistema Nacional de Control de Alimentos (SNCA) con el objetivo de asegurar el cumplimiento del Código Alimentario Argentino (CAA), que es la norma fundamental del SNCA y que integra a la Comisión Nacional de Alimentos (CONAL), al Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) y a la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT).

La calidad de alimentos está regulada por el Código Alimentario Argentino (CAA, 2006), ampliado con normas del MERCOSUR y del CODEX, a través de sus artículos 555, 556, 556 bis del Capítulo VIII. En el artículo 556 del CAA, se describen los valores de Límites Máximos de Residuos (LMRs) de plaguicidas y antibióticos que puede estar presente en la leche. Dichos valores fueron aprobados por la Comisión del Codex Alimentario en su décimo séptimo período de sesión.

El SENASA de Argentina, por medio de la Resolución N° 256/2003 (SENASA, 2003), adoptó los LMRs establecidos por el CODEX (CODEX 1996, 2007), aunque se debe destacar que, en caso de realizar exportaciones a USA o países miembros de la Unión Europea, los límites de residuos estarán condicionados a las reglamentaciones de cada país.

En Argentina, el plan CREHA (Plan Nacional de Control de Residuos e Higiene en Alimentos) persigue como objetivo preservar los productos de la alimentación humana según lo establecido en el Cap. IX del Dec.4238/68. Resolución 290. Este Plan prioriza los residuos químicos, aditivos, toxinas, y microorganismos que se controlarán mediante un programa anual. Además determina aquellos que constituyen un mayor riesgo para la salud pública, cumpliendo de esta manera con las exigencias

y los Límites Máximos Admitidos, según las legislaciones y normas nacionales e internacionales vigentes.

SENASA solicita análisis para antibióticos, tetraciclinas, cloranfenicol, sulfonamidas, ivermectina, albendazol, plomo, cadmio, arsénico, mercurio, aflatoxinas, clorados y fosforados. Los muestreos se deben realizar cada dos meses, 1 o 2 veces al año, según la cantidad de litros anuales que se procesen (nivel de producción I, II, III). Los resultados deben ser inferiores a los LMRs que establece el CODEX y los métodos analíticos recomendados para analizar las muestras de leche son la cromatografía en capa fina, HPLC, electroforesis, ELISA, bioensayos, métodos microbiológicos, entre otros (SENASA, 1999, 2000, 2001, 2003).

En la Tabla I.6 se indican los LMRs establecidos por la Legislación Europea, los niveles fijados por el CODEX y las tolerancias de USA para sustancias quimioterapéuticas y antibióticos utilizados en ganado lechero. Los Límites Máximos Admitidos por el Código Alimentario Argentino, no se señalan puesto que coinciden con los LMR establecidos por el CODEX.

1.2.5.2. Determinación de los Límites Máximos de Residuos

El concepto de residuo de medicamento veterinario adoptado por el Codex Alimentarius incluye tanto a una sustancia pura como a la suma de los productos procedentes de su biotransformación que pueden permanecer en los alimentos derivados de un animal tratado.

Cuando los efectos adversos de una sustancia se han evaluado mediante estudios en laboratorio, los efectos tóxicos observados deben extrapolarse al hombre. En general resulta difícil evaluar los efectos de una sustancia sobre el hombre, por lo que se realizan estudios in vitro o en animales de experimentación. Por ello, el JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) emplea una amplia variedad de estudios toxicológicos que persiguen como objetivo identificar los efectos negativos que las diferentes sustancias causan sobre la salud del consumidor. Estos estudios combinan test de toxicidad aguda, sub-aguda y crónica, efectos sobre la reproducción, teratogenicidad, mutagenicidad, carcinogenicidad, efectos inmunológicos y estudios microbiológicos.

Tabla I.6. Límites máximos de residuos (LMRs) establecidos por el Codex Alimentarius, Unión Europea y niveles de tolerancia en USA de antimicrobianos en leche

Sustancia	LMR Codex ¹	LMRs EU ²	SL/Tolerance USA ³
<i>β-lactámicos</i>			
Penicilina (Benzil-,G)	4	4	5
Ampicilina		4	10
Amoxicilina		4	10
Cloxacilina		30	10
Dicloxacilina		30	
Oxacilina		30	
Nafcilina		30	
Ceftiofur®	100	100	50
Cefapirina		60	20
Cefazolina		50	
Cefquinoma		20	
Penetamato		4	
Acido Clavulánico		200	
<i>Tetraciclinas</i>			
Clortetraciclina		100	300
Oxitetraciclina	100	100	300
Tretetraciclina		100	300
<i>Sulfonamidas (todas)</i>			
Sulfadimidina	25	100	10
Sulfadimetoxina		100	10
Sulfameracina		100	10
Sulfatiazol		100	10
Sulfadiazina		100	10
<i>Macrólidos</i>			
Eritromicina		40	50
Espiramicina	200	200	
Tilmicosina		50	
Tilosina		50	50
<i>Aminoglucósidos</i>			
Gentamicina		100	30
Neomicina	500	1500	150
Espectinomicina		200	
DH/Estreptomina	200	200	125
<i>Quinolonas</i>			
Enrofloxacina		100	
Flumequine		50	
Marbofloxacina		75	
<i>Varios</i>			
Baquiloprim		30	
Cloranfenicol		0	0
Celestina		50	
Dapsona		0	
Novobiocina		50	100
Rifaximina		60	
Trimetoprim		50	

Unidades: µg/Kg

¹Codex Alimentarius (<http://apps1.fao.org/servlet/org.fao.waicent.codex.VetDrugServlet>) 30 Marzo 2007;²Reglamento 2377/90 y sucesivos reglamentos modificadores. Enero 2009; ³Code of Federal Regulation (CFR) 21 Part 556 (M-I-05-5) 27 Setiembre Junio 2005: Safe level y/o Tolerance (FDA, 2003).

Como resultado de estas pruebas sobre animales de laboratorio se determina el NOEL (Nivel de Efecto No Observable) y se calcula la Ingesta Diaria Admisible conocido como ADI (Acceptable Daily Intake). En los cálculos se aplica un factor de seguridad. La Ingestión Diaria Admisible (ADI) es definida por el Codex como la estimación que realiza el JECFA de la cantidad de un medicamento veterinario, expresada sobre la base del peso del cuerpo (60 kg), que puede ser ingerida diariamente durante la vida sin presentar un riesgo apreciable para la salud.

El factor de seguridad que se emplea normalmente es “100” y está compuesto por dos factores, el primero contempla que el hombre puede ser más sensible que los animales de laboratorio utilizados en los experimentos, mientras que el segundo tiene en cuenta la variabilidad genética de cada individuo al consumir estos residuos. El factor de seguridad se puede ver incrementado en caso de observarse algún efecto tóxico durante los estudios toxicológicos.

El grado de exposición del consumidor a un cierto residuo se estima basándose en el consumo medio de alimentos que podrían contener estos residuos. A efectos internacionales, se ha asumido que la ingesta media diaria del hombre es de 300 g de músculo, 100 g de hígado, 50 g de riñones, 50 g de grasa, 100 g de huevos, 20 g de miel y 1.5 l de leche. En base a estos consumos se calculan los LMRs para cada alimento.

Cuando el contenido de un residuo en un tejido concreto es demasiado bajo para un control fiable después de transcurrido el periodo de supresión recomendado para dicho residuo en otros tejidos, entonces no se propone LMR para ese tejido concreto.

Con respecto a los LMRs en Argentina, el SENASA (SENASA, 2009) detalla que *“Los límites establecidos para residuos de drogas en alimentos están expresados en términos de tolerancia o límites máximos residuales (LMR). Ambos términos son sinónimos. La tasa de tolerancia es la máxima concentración permitida de residuo de una sustancia extraña que puede existir en un alimento en el momento de su consumo. Su determinación se lleva a cabo por extensas pruebas toxicológicas. En una primera instancia se determina la dosis máxima inocua para animales de experimentación (Nivel Sin Efecto). La centésima parte de esta dosis se considera dosis máxima admisible para el hombre, esto es la Ingesta Diaria Admisible (IDA), y se entiende como tal a aquella cantidad de sustancia extraña, expresada en mg, que el hombre puede ingerir cada día por kilogramo de peso corporal durante toda su vida sin que su salud sufra peligro. De la IDA se deduce la máxima cantidad de sustancia*

residual soportable presente en el alimento, de acuerdo con el peso corporal medio y el consumo diario habitual en el país (Nivel Permisible). Si se toma en consideración la cantidad residual real tras el empleo de la sustancia, la banda cuantitativa de utilización y la limitación de empleo exigible en la práctica, se obtiene la tasa de tolerancia para una sustancia química concreta”.

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

I.3.1. SISTEMA INTEGRADO PARA LA DETECCIÓN DE ANTIBIÓTICOS

Los primeros métodos de tipo microbiológicos para la detección de residuos de antibióticos en la leche se empezaron a utilizar en la década de los años 50 (Bishop y White, 1984). Estos bioensayos se basaban fundamentalmente en pruebas de inhibición microbiológicas como la de difusión en agar, en la inhibición de la producción de ácido, o en la inhibición de la coagulación de cultivos iniciadores (Mitchell *et al.*, 1998).

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

Sin embargo, el problema de analizar residuos en la leche es complejo, ya que no se sabe cuándo existe un residuo y además, en el caso que el residuo esté presente, se desconoce su naturaleza y la concentración del mismo. La estrategia analítica para detectar el mayor número de sustancias antimicrobianas en la leche se debe basar en combinar las metodologías existentes según el objetivo perseguido.

La Figura I.8. expone un sistema integrado para el control y la detección de residuos de antibióticos basado en la propuesta de Heeschen y Shuren (1995) en el Simposio de la Federación Internacional de Lechería celebrado en Kiel (Alemania) sobre “Residuos de medicamentos antimicrobianos y otros inhibidores en leche”.

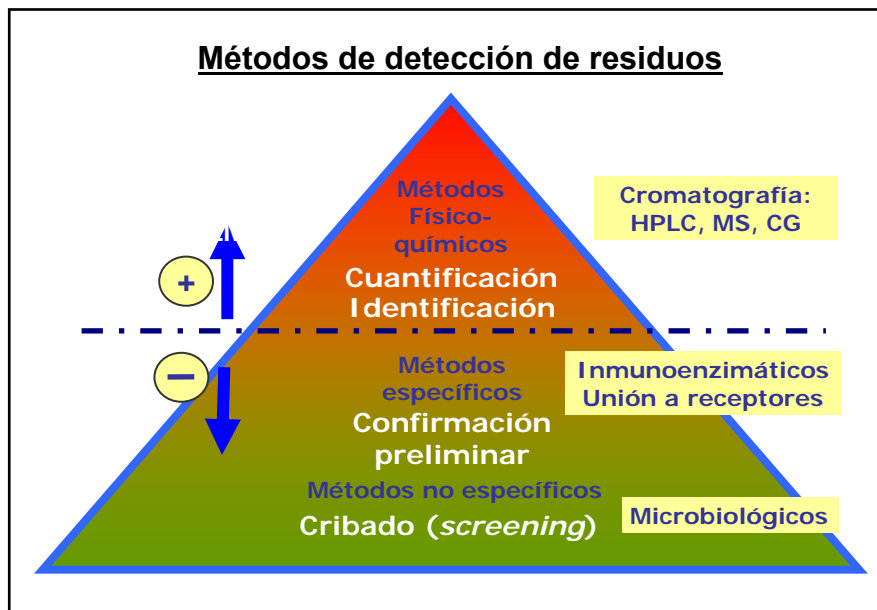


Figura I.8. Sistema integrado de control de residuos de antibióticos y sulfamidas en leche (Heeschen y Shuren, 1995).

El presente sistema consta de dos etapas:

Primera etapa de screening o cribado: Se realiza un control primario mediante el empleo de:

- *Métodos lentos* de tipo microbiológicos que son más económicos y que permitan garantizar la ausencia de antimicrobianos en la leche o su presencia a niveles superiores a los LMRs. Ofrecen una respuesta de tipo dicotómica que se pone de manifiesto por un simple cambio de color en un indicador (ácido-base o redox) presente en el medio de cultivo.
- *Métodos rápidos* específicos de identificación (como los métodos enzimáticos, de receptores proteicos, etc) donde se identifica el tipo de familia a la cual pertenece(n) los antimicrobiano(s), como por ejemplo los métodos enzimáticos que son específicos para la detección de residuos de antibióticos betalactámicos.
- *Sistemas Microbiológicos Multiplacas* (SMMP) que emplean diversos microorganismos de prueba en medios de cultivos específicos para detectar e identificar un amplio número de antibióticos pertenecientes a diferentes familias. Estos sistemas se basan en la difusión en el agar (caja de Petri) de los agentes antimicrobianos presentes en la leche y su posterior medición del diámetro del halo inhibitorio.

El objetivo de esta primer etapa es analizar a un bajo costo y con personal no especializado, una gran cantidad de muestras de leche, de modo tal de hacer un control a "nivel primario" de la calidad de la leche que entregan los productores y que ingresa a las plantas industriales. Aquellas muestras que otorgan resultado "positivo" pueden ser evaluadas mediante métodos de cuantificación e identificación de tipo fisicoquímico en la etapa posterior.

Segunda etapa de cuantificación e identificación: Una vez identificada la familia a la cual pertenece el antimicrobiano (betalactámicos, tetraciclinas, sulfamidas, quinolonas, macrolidos, aminoglucósidos, etc.) mediante métodos de screening específicos o por el SMMP, se procede a una identificación y cuantificación "inequívoca" de la molécula específica del grupo de antimicrobiano detectado en la etapa anterior. En esta segunda etapa se emplean técnicas analíticas avanzadas como cromatografía HPLC, Electroforesis capilar (Vera Candioti, 2009), etc.

En Argentina, el Plan Anual de Residuos y Toxinas en alimentos de origen animal (CREHA) con fecha 14 de marzo del 2008, proveniente del Servicio Nacional de Sanidad (SENASA, 2008) y Calidad Agroalimentaria dependiente de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación (SAGPyA) establece las técnicas analíticas que se pueden emplear para la detección y cuantificación de diferentes tipos de xenobióticos presentes en la leche. Así, para la detección de antibióticos (penicilinas, tetraciclinas, estreptomina, neomicina, eritromicina, entre otros) se establece el uso de métodos microbiológicos, (Fast TestY 4-Placas, Swab test), bioensayos o técnicas de cromatografía por HPLC. Para el caso de quinolonas (enrofloxacin, ciprofloxacina), macrólidos (tilosina, tilmicosina, espiramicina y neoespiramicina) y aminoglucósidos (estreptomina y dihidroestreptomina) se recomienda el uso de cromatografía HPLC o HPLC-MS-MS (Tabla I.7).

En la Unión Europea, mediante la Decisión 2002/657/CEE (CEE, 2002a) establece que los métodos de control se deben dividir en dos grupos, métodos de "cribado" (o screening) y métodos de "confirmación posterior". En el primer grupo se incluyen aquellos métodos rápidos que se utilizan para detectar la "presencia" o "ausencia" de sustancias, o grupos de sustancias, permitiendo analizar un elevado número de muestras, mientras que en el segundo grupo se incluyen aquellas técnicas

analíticas que suministran información total y complementaria para identificar y cuantificar de manera inequívoca el residuo presente en la leche.

Tabla I.7. Técnicas analíticas autorizadas por SENASA en Argentina para la detección de residuos de antibióticos en la leche

Sustancias	Compuesto	Método Analítico	LD	Nivel de acción
Antibióticos (Screening)	Estreptomina	Microbiológicos	600	600
	Neomicina	Fast Test Y 4-	2500	2500
	Eritromicina	Placas	100	100
	Penicilina	Swab Test	0.06U/g	0.06U/g
	Tetraciclinas	Bioensayos	400	400
	Otros	HPLC	Halo 2mm	Inhibición ≥ 2mm
Tetraciclinas	Tetraciclina	HPLC	20	100
	Oxitetraciclina		10	
	Clortetraciclina			
Macrólidos	Tilosina	HPLC	10	50
	Tilmicosina		10	50
	Espiramicina		10	200
Aminoglucósidos	Estreptomina Dihidroestreptomina	HPLC	20	600
Quinolonas	Enrofloxacina Ciprofloxacina	HPLC	6	30
Sulfamidas	Sulfadimetoxina	HPLC	25	100
	Sulfametazina			
	Sulfatiazol			
	Sulfadiazina			
	Sulfametoxazol Sulfisoxazol			

Fuente: Plan Anual 2008 de Residuos y toxinas en alimentos de origen animal. SENASA (2008).

1.3.2. MÉTODOS DE CRIBADO O SCREENING

1.3.2.1. Métodos de inhibición microbiológicos

Los ensayos de inhibición microbiológica fueron los primeros métodos utilizados para la detección de residuos de antibióticos (Myers, 1964; Mitchell *et al.*, 1998) y continúan empleándose en la actualidad. Dichos ensayos presentan las ventajas de ser muy rentables y tener la capacidad de detectar un amplio espectro de familias de antibióticos, a diferencia de los métodos inmunológicos o de receptores proteicos, que son específicos para determinadas familias.

Estos métodos se emplean en una primera etapa y constituyen el primer paso dentro de un programa de control de residuos. Son métodos cualitativos, cuyo objetivo

es determinar la "presencia" o "ausencia" de residuos a niveles superiores a los LMRs, en forma precisa y segura (Botsoglou y Fletouris, 2001).

Existen en el mercado diferentes tipos de métodos microbiológicos que pueden detectar de forma rápida la presencia de residuos de antibióticos y sulfonamidas en leche (IDF-FIL, 1991; Cullor, 1992; Cullor *et al.*, 1992; Heeschen, 1993; Cullor *et al.*, 1994). Estos métodos son, en general, inespecíficos, motivo por el cual se pueden utilizar para la detección de un gran número de sustancias. Por el contrario, no es posible identificar un analito en forma inequívoca, así como tampoco es posible cuantificar su concentración en una muestra.

Los primeros métodos que se desarrollaron fueron de inhibición microbiológica (Reybroek, 1995^{a,b}; Suhren, 1995; Mitchell *et al.*, 1998; Botsoglou y Fletouris, 2001), basándose en la inhibición del crecimiento de microorganismos sensibles a los residuos de antibióticos presentes en la leche, acompañados de un indicador que denota el crecimiento bacteriano en virtud de la capacidad que poseen las bacterias de producir ácido o reducir colorantes en un medio de cultivo, de manera que el resultado puede interpretarse visualmente.

Como microorganismo de prueba utilizan *Geobacillus stearothermophilus* var *calidolactis* (Carlsson y Björck, 1987) antes denominado *B. stearothermophilus* (Nazina *et al.*, 2001), también se puede utilizar *B. cereus* (Suhren *et al.*, 1996), *B. subtilis* ATCC 6633 (Aureli *et al.*, 1996), *S. thermophilus* (Mourot y Loussouron, 1981) o *G. Kaustophilus* (Condón *et al.*, 2006).

En el primer paso de la técnica analítica, se coloca la leche en un medio de cultivo agarizado que contiene esporas del microorganismo y un indicador ácido-base o redox. Durante la etapa de incubación, los antimicrobianos presentes en la leche difunden a través del medio y en aquellos casos que se encuentre presente suficiente cantidad de sustancia antimicrobiana, el crecimiento del microorganismo se verá reducido o inhibido, permaneciendo el color original del indicador. Por el contrario, cuando la leche esté libre de sustancias antimicrobianas, las esporas del microorganismo se desarrollarán y producirán un cambio en el color del indicador.

Estos métodos poseen la desventaja que, cualquier sustancia inhibidora natural ("no artificial") de la leche, evitará el desarrollo microbiano, acusando resultados de tipo "falso positivo", también llamados "resultados anómalos" y se pueden deber a elevados niveles de enzimas lactoferrina, lisozima, lactoperoxidasa (Carlsson y Björck, 1987; Beukers, 1991; Shiffmann *et al.*, 1992), ácidos grasos libres (Mäyrä-Mäkinen,

1990) o recuentos de células somáticas (Carlsson y Björck, 1989; Tyler *et al.*, 1992; Van Eenennaam, 1993, Althaus *et al.*, 2003) que se pueden encontrar en la leche.

I.3.2.1.1. Principales métodos microbiológicos comerciales

La Tabla I.8. resume los principales métodos de screening de tipo microbiológicos, acompañados de los indicadores y condiciones de incubación. Entre los métodos más difundidos se destacan aquellos que utilizan el *G. stearothermophilus*, como BRT[®] AiM, Charm[®] Blue Yellow, Delvotest[®] y Eclipse[®].

Método BRT[®] AiM (Brillant Black Reduction Test): La empresa AiM Analytik in milch Produktions-und Vertriebs-GmbH (Munich, Alemania) comercializa 3 versiones de este método, el test BRT[®] con predifusión, el test BRT[®] sin predifusión y el test BRT[®] MRL Screening (AiM, 2003) que posee una sensibilidad mejorada para sustancias del grupo de los macrólidos, de las sulfamidas y de los aminoglucósidos, acercando los límites de detección de algunas sustancias a los LMR de la Unión Europea.

Este test utiliza negro brillante como indicador redox (Müller y Jones, 1993). La ausencia de antibiótico en la muestra de leche permitirá el crecimiento del microorganismo que reducirá en forma irreversible el indicador a un color amarillo-anaranjado (IDF-FIL, 1991). Este método está recomendado en Alemania y en otros países de la CEE por tratarse de una metodología económica, simple y rápida (Suhren, 2002). Presenta buena sensibilidad para los antibióticos betalactámicos (Frank, 1995; Charm y Ruth, 1993), aunque detecta medianamente los residuos de tetraciclinas (Luitz y Suhren, 1995a,b) y sulfonamidas (Heeschen, 1993; Heschen y Blüthgen, 1995; Frank, 1995).

Charm[®] Blue Yellow. El método Charm Blue Yellow[®] (Charm Sciences Inc, Massachussets, USA) es un test microbiológico de amplio espectro para la detección de residuos de antimicrobianos en leche que utiliza esporas de *G. stearothermophilus* var. *calidolactis* y púrpura de bromocresol como indicador (Zomer y Lieu, 1995). Este método detecta a niveles iguales o ligeramente inferiores al LMR sustancias pertenecientes a cinco familias de antimicrobianos (Charm y Zomer, 1995). Existe una versión automatizada que facilita el análisis de un alto volumen de muestras, es la

versión Charm AIM-96-HVS (High Volume System) y permite que un único operario analice de 1000 a 5000 muestras con sólo 2 horas.

Tabla I.8. Principales bioensayos microbiológicos para la detección de residuos de antibióticos en la leche

Test	Organismo	Incubación	Indicador
Accusphere test	<i>S. thermophilus</i> en esferas	4 h a 45°C en tubo	Púrpura de bromocresol (visual, cambio color)
Test de acidificación	<i>S. thermophilus</i> TJ	2.5 h a 45°C en tubo	Púrpura de bromocresol (visual, cambio color)
Arla test	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633 en tableta	6 h a 40°C en microplaca	Cloruro de trifenilterazolium (visual, cambio color)
Test de bioluminiscencia	<i>S. thermophilus</i> TJ	20, 40 y/o 60 min a 45°C en tubo	Luciferín-luciferasa (uso de luminómetro)
Test de campo de <i>B. subtilis</i>	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	14-24 h a 32°C ó 5-7 h a 37°C en placas con agar	No (visual, observación zona inhibición)
BR Test (BRT AiM, BR Test AS, Blue Star, 6, 7, AS-Special, AS- Brilliant ...)	<i>G. stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i> ATCC 10149 en agar	2.5 a 3.5 h a 60-70°C en microplacas	Negro brillante (visual, cambio color) o fotométrico
Test Eclipse	<i>G. stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i> ATCC 10149 en agar	2.5 a 3.5 h a 65°C en microplacas	Púrpura de bromocresol (visual, cambio color) o fotométrico
Copan test (CH ATK)	<i>G. stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i> ATCC 10149 en agar	3 h a 65°C en microplacas	Púrpura de bromocresol (visual, cambio color) o fotométrico
Charm Farm test	<i>G. stearothermophilus</i> en tableta	3.8 h a 67°C en tubo	Púrpura de bromocresol (visual, cambio color)
Charm inhibition Assay	<i>G. stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i> ATCC 10149	2.3 a 64°C en placas de agar	Púrpura de bromocresol (visual, cambio color)
Ensayo de disco para penicilina	<i>G. stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i> ATCC 10149	3-4 h a 55°C o 2-3 h a 64°C en placas de agar	Púrpura de bromocresol (visual, cambio color)
Delvotest P/SP	<i>G. stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i> ATCC 10149	2.5 h a 64°C en ampollas o en microplacas de poliestireno	Púrpura de bromocresol (visual, cambio color) o fotométrico
Test de inhibición con <i>Sarcina lutea</i>	<i>Sarcina lutea</i> ATCC 9341	16-18 h a 30°C en pocillos excavados en el agar	No (visual, observación zona de inhibición)
Test Lumac	<i>S. thermophilus</i> OL 1010.59	35 min a 41°C en cubetas Lumac	3-(4,4-dimethylthiazolyl-2-) 2,5-diphenyl-tetrazolium bromide
Test de difusión en tubo	<i>G. stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i> ATCC 10149	2.5-2.75 a 64°C en tubo	Púrpura de bromocresol (visual, cambio color)
Valio T101 test	<i>S. thermophilus</i> T101	4.5 h a 42°C en viales o microplacas	Púrpura de bromocresol (visual, cambio color)

Fuente: Botsoglou y Fletouris (2001).

Método Delvotest[®]: La casa fabricante (DSM Food Specialties, Delf, Holanda) comercializa el método en dos versiones Delvotest[®] “SP” (con comprimido que aporta los nutrientes al medio agarizado) y Delvotest[®] “SP-NT” (con los nutrientes incorporados en el medio agarizado). Hace pocos años ha salido al mercado, el método Delvotest[®] Accelerator. Se trata de una nueva metodología automatizada y de sensibilidad igual al Delvotest[®] SP-NT clásico, que permite detectar un amplio espectro de antibióticos y reducir el tiempo de análisis hasta los 100 minutos.

El método utiliza púrpura de bromocresol como indicador de pH. Se trata del método más difundido a nivel mundial, considerándose como un método sencillo, fiable, económico y de una amplia vida útil (Beukers, 1991), con buena sensibilidad para detectar residuos de antibióticos betalactámicos (Charm y Ruth, 1993) y media para tetraciclinas (Van Os y Beukers, 1980) y sulfonamidas (Charm y Ruth, 1993). Es considerado un método seguro y exacto por la AOAC (Kelly, 1982; AOAC, 2000).

Método Eclipse[®]: Elaborado por la empresa ZEU-Inmunotec S.A. (Zaragoza, España) contiene esporas de *G. Kaustophilus* y púrpura de bromocresol. Este método, de fabricación nacional, se presenta en varias versiones: Eclipse[®] 100, Eclipse[®] 50, Eclipse[®] Farm (en formato de tubos individuales) y Eclipse[®] Screening Plus. En esta última versión comercial, se ha mejorado la sensibilidad frente a aminoglucósidos y macrólidos (ZEU-Inmunotec, 2003).

Las versiones Eclipse[®] 100 y Eclipse[®] Screening Plus requieren una fase previa de predifusión durante 1 hora antes de la incubación a 65 °C durante 2 horas y 15-30 minutos. Por el contrario, la versión Eclipse[®] 50 no requiere predifusión.

El método es similar al bioensayo Delvotest[®] en cuanto a su fundamento y límites de detección para antibióticos betalactámicos y similares límites para las tetraciclinas y sulfonamidas, sin embargo no detecta residuos de macrólidos y quinolonas (Condón *et al.*, 2006).

I.3.2.1.2. Mejoras en los métodos microbiológicos para la detección de antibióticos

La mayoría de los métodos de inhibición microbiológica utilizan como bacteria-test *G. stearothermophilus* que se caracteriza por presentar buena sensibilidad para los residuos de antibióticos betalactámicos en la leche, no así, para los residuos de otros antimicrobianos como tetraciclinas, sulfamidas, aminoglucósidos y quinolonas.

Por ello, con el propósito de mejorar la sensibilidad de esta bacteria-test hacia las tetraciclinas, algunos autores recomiendan el uso de agentes quelantes en el medio de cultivo, tales como el ácido glicol-bis (2-aminoetileter) N,N,N',N'-tetraacético (EGTA) (Adriany *et al.*, 1995) o el uso de sales del ácido oxálico (Langeveld, 2005; Langeveld *et al.*, 2005), ya que estas sustancias actúan capturando iones divalentes (Ca^{+2} , Mg^{+2}) presentes en la leche. En efecto, los residuos de tetraciclinas poseen una elevada afinidad por estos iones divalentes y la incorporación de los agentes quelantes facilita la disponibilidad de las tetraciclinas, acompañado de una disminución en los límites de detección del bioensayo.

Otra posibilidad de mejorar la sensibilidad a las tetraciclinas se puede lograr mediante la incorporación de cloranfenicol (CAP) en el medio de cultivo, ya que su acción combinada con las tetraciclinas produce una inhibición más pronunciada en la síntesis proteica de las bacterias. De hecho, las tetraciclinas interfieren con la unión entre "aa- tARN" y el sitio A del ribosoma "30S" (Tritton, 1977), evitando de esta forma la elongación de la cadena peptídica. En forma similar actúa el cloranfenicol, al evitar que tARN se una al ribosoma "50S" (Lessard y Pestka, 1972).

A modo de antecedentes, se puede mencionar que, en el Sistema Microbiológico en Multirresiduo, Nouws *et al.* (1999a,b), al emplear *B. cereus* como bacteria-test en la placa de Petri específica para las tetraciclinas, incorpora 100 µg/l de cloranfenicol para mejorar la sensibilidad a este antimicrobiano.

En forma similar, las sulfamidas son compuestos que no llegan a detectarse por *G. stearothermophilus* var. *calidolactis*, motivo por el cual numerosos autores proponen la incorporación de antifolatos en el medio de cultivo para mejorar la sensibilidad de la bacteria-test hacia estas moléculas.

De este modo, Gudding (1976) sugiere una concentración de 25 µg/l de trimetoprim (TMP) en el medio de cultivo que utiliza *G. stearothermophilus*, Langeveld *et al.* (2005) un nivel de 60 µg/l, mientras que Adriany *et al.* (1995) utilizan concentraciones de 50 µg/L. Por el contrario, Nouws *et al.* (1995) emplean niveles de TMP más elevadas (150 µg/l) en el diseño de un test microbiológico sensible a sulfamidas.

Para ensayos de difusión en placas de Petri que emplean *B. subtilis* como bacteria test, Okerman *et al.* (1998), Myllyniemi *et al.* (2001) utilizan 50 µg/l de TMP, mientras que Koenen-Dierick y De Beer (1998) emplean 200 µg/l de TMP.

Por todo ello, y en virtud de las discrepancias halladas en la bibliografía consultada, resulta conveniente llevar a cabo estudios con el propósito de establecer las condiciones óptimas para la elaboración de bioensayos de inhibición microbiológica.

1.3.2.2. Métodos específicos

Los métodos específicos conocidos coloquialmente como métodos “rápidos” fueron diseñados para identificar la familia a la cual pertenecen los antimicrobianos presentes en la leche y otorgan resultados “positivos” o “negativos” en la etapa de “screening” o “cribado”, muchos de ellos validados por la FDA/AOAC y/o la FIL para su uso en leche cruda de vaca (FDA M-I-96-10 Revision #3; AOAC, 2000; FIL 258/1991). Numerosas empresas lácteas utilizan test rápidos (Tabla I.9) que permiten una detección más específica de los antimicrobianos en la leche como betalactámicos, tetraciclinas, etc, o moléculas individuales como cloranfenicol, gentamicina, etc.

Tabla I.9. Características de los principales métodos rápidos para la detección de residuos de antibióticos en la leche

Método rápido	Principio	Detección	Casa fabricante
Penzym®	Enzimático (DD-carboxipeptidasa)	Betalactámicos	UCB, Bioproducts, Braine-L'Alleud, Bélgica
BETA STAR®	Receptor proteico	Betalactámicos	UCB, Bioproducts, Braine-L'Alleud, Bélgica
Delvo XP®	Receptor proteico	Betalactámicos	DSM Food Specialties, Delf, Holanda
ROSA Charm®	Receptores proteicos	Familias de antimicrobianos	Charm Sciences, EEUU
Charm® MRL	Receptores proteicos	Betalactámicos	Charm Sciences, EEUU
Twinsensor®	Receptores proteicos	Betalactámicos Tetraciclinas	Unisensor, Lieja, Bélgica
SNAP®	Receptores proteicos	Betalactámicos	IDEXX Laboratoires Inc. Westbrook, EEUU
SNAP® Tetracycline test	Receptores proteicos	Tetraciclinas	IDEXX Laboratoires Inc. Westbrook, EEUU

Se trata de métodos rápidos que ofrecen resultados bastante exactos en escasos minutos (8-20 minutos), a diferencia de los métodos de inhibición

microbiológicos que requieren un tiempo comprendido entre 3 a 4 horas para obtener el resultado. Por el contrario, el costo de los métodos rápidos es más elevado que los métodos microbiológicos (8 a 15 veces superior).

Los métodos postcribado disponibles en el mercado, pueden ser de tipo enzimático, como aquellos que utilizan la enzima DD-carboxipeptidasa que se inhibe por la presencia de anillos betalactámicos (Penzym[®], Chr. Hansen, Hørsholm, Dinamarca), los métodos de tipo inmunoenzimáticos, que emplean anticuerpos específicos, eliminando las reacciones cruzadas (Fluorophos Betascreen[®], Lacteck[®], Parallax[®], Ridascreen[®] Antibiotics, Transia[®] GmbH,) o de receptores proteicos, con receptores específicos, por ejemplo los betalactámicos como Beta Star[®] (UCB Bioproducts, Braine-L'Alleud, Bélgica/Chr. Hansen, Hørsholm, Dinamarca), Delvo[®]-X-Press β -L (DSM Food Specialties, Delf, Holanda), ROSA Charm[®] (Charm Science Inc., EEUU), SNAP[®] (IDEXX Laboratoires Inc., Westbrook, EEUU) y Tetrasensor[®] (Unisensor, Lieje, Bélgica).

También existen en el mercado una diversidad de métodos basados en técnicas ELISA con anticuerpos monoclonales específicos para analitos concretos, que permiten el análisis de moléculas específicas como sulfametazina, sulfadiacina, sulfaquinoxalina, cloranfenicol, neomicina, gentamicina, estreptomicina, tetraciclinas, trimetoprim, enrofloxacin, etc. (Macho, 2003).

1.3.2.3. Sistemas Microbiológicos Multiplacas (SMMP)

Dentro de estos métodos de cribado se destacan los “Sistemas Microbiológicos Multirresiduo” (SMMR) que persiguen como objetivo la detección de antibióticos y su identificación dentro de una familia de antimicrobiano. Estos métodos, de inhibición microbiológica, se conocen como pruebas de difusión en placas, porque el antimicrobiano presente en la leche difunde radialmente desde el interior de una perforación efectuada en el agar de una caja de Petri que contiene la muestra de leche a analizar; hacia el exterior de la perforación. Por el contrario, los métodos microbiológicos en microplacas ELISA se denominan métodos de difusión en tubos, porque los antibióticos difunden desde la superficie hacia el interior del tubo.

Estos SMMR hacen uso de múltiples microorganismos de prueba, sensibles para cada familia de antimicrobiano y se basan en la difusión de la muestra a analizar en un agar con diferentes condiciones de pH y concentración de esporas, que se llevan a cabo en cajas de Petri. La sensibilidad, se manifiesta mediante la presencia

de halos de inhibición alrededor de la muestra luego de esperar un tiempo comprendido entre 18 y 24 horas. Debido a la importancia que reviste estos sistemas, se detallarán en el apartado 1.4 de este capítulo.

1.3.3. MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN

En esta etapa se analizan únicamente aquellas muestras de leche, cuyos residuos fueron previamente identificados como pertenecientes a una “familia” de antimicrobiano. Los métodos utilizados en la etapa de confirmación y cuantificación, permiten identificar y cuantificar de una forma inequívoca la presencia de moléculas específicas de antimicrobianos en las muestras de leche.

Se han desarrollado numerosas metodologías que se encuentran disponibles para la detección cuantitativa de diversos grupos de antimicrobianos. Sin embargo, estos métodos son caros y muy laboriosos, ya que requieren de la preparación previa de la muestra a analizar y el tratamiento depende a su vez del analito a investigar. Por este motivo, resulta muy valioso saber de ante mano la familia de antimicrobiano a la cual pertenece, para poder elegir la técnica de purificación y el equipo HPLC a utilizar.

En la actualidad, las técnicas cromatográficas son las que se emplean con mayor frecuencia para la identificación y cuantificación de residuos de antimicrobianos en la leche, especialmente la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) del inglés High Performance Liquid Chromatography, denominada actualmente de una forma más simple como cromatografía líquida (LC, del inglés Liquid Chromatography).

A modo de ejemplo se puede mencionar que, para el análisis de antibióticos betalactámicos en leche se utilizan las técnicas LC con fraccionamiento por “cleanup”, y con detectores convencionales tales como el de fluorescencia, fotodiodos y UV-visible (Holstege *et al.*, 2002), para las tetraciclinas se utilizan las técnicas de cromatografía líquida con detectores de fluorescencia, ultravioleta y fotodiodos (Kaale *et al.*, 2007, Spisso *et al.*, 2007) o analizador simple cuadrupolo (Koesukwiwat *et al.*, 2007; Martins-Júnior *et al.*, 2007), analizador MS/MS de triple cuadrupolo (Andersen *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005; De Ruyck y De Rieder, 2007).

Las sulfamidas son detectadas con equipos HPLC con detectores UV y PDA (Furusawa y Kishida, 2004; Yang *et al.*, 2004; When *et al.*, 2005), fluorescencia (Eder *et al.*, 1997), o detección por espectrométrica de masas con fuentes de ionización por

electrospray positiva y analizador simple (Bogialli *et al.*, 2002; Cavalière *et al.*, 2003; Koesukwiwat *et al.*, 2007) o triple cuadrupolo (Van Rhijn *et al.*, 2002).

1.3.4. PROPIEDADES DE LOS MÉTODOS CUALITATIVOS

El objetivo de la validación de un procedimiento analítico es demostrar que el mismo resulta conveniente para el propósito previsto. La Tabla I.10. muestra las principales propiedades que se deben tener en cuenta en los estudios de validación para diferentes técnicas analíticas según la Decisión 2002/657/EC de la Unión Europea sobre validación de métodos analíticos.

Se observa que, en caso de métodos cualitativos, tipos “screening” o “cribado”, se deben evaluar únicamente los parámetros de selectividad, límite de detección y robustez. Aunque la guía ISO/FDIS 13969 (IDF-FIL, 2002) destaca además la importancia de llevar a cabo estudios de tipo colaborativos (reproducibilidad) y la IDF-FIL (1999) sugiere efectuar estudios de sensibilidad.

Por ello, y debido a la importancia que reviste el análisis de las propiedades más importantes en los métodos de screening o cribado, a continuación, se desarrollarán aquellas propiedades que deben considerarse durante un proceso validación de estos métodos.

Tabla I.10. Propiedades a evaluar para la validación de diferentes métodos analíticos

Característica performance	Métodos cualitativos		Métodos cuantitativos	
	Screening	Confirmatorio	Screening	Confirmatorio
Límite Detección $CC\beta$	+	+	+	+
Límite Decisión $CC\alpha$	-	+	-	+
Recuperación	-	-	-	+
Presición	-	-	+	+
Selectividad	+	+	+	+
Robustez Estabilidad	+	+	+	+

Fuente: Decisión 2002/657/EC.

1.3.4.1. Límites de detección

Según la Directiva 93/257/CEE (CEE, 1993), se entiende por límite de detección como “*el menor contenido a partir del cual resulta posible deducir la presencia de sustancias analizadas con seguridad estadística razonable*”. En el caso de utilizarse métodos microbiológicos para la detección de inhibidores en la leche, la norma ISO/FDIS 13969 (IDF-FIL, 2002) establece una guía para la determinación de los principales parámetros de calidad para los métodos microbiológicos.

Suhren *et al.* (1997) y IDF-FIL (1999, 2002) proponen la metodología que debe utilizarse para la determinación de los límites de detección de antibióticos en leche cuando se emplean métodos microbiológicos de cribado.

En primer lugar se debe garantizar la calidad de la leche que se empleará para preparar las disoluciones fortificadas. Al respecto, IDF-FIL (2002) destaca que las muestras de leche que serán utilizadas como “control negativo” deben provenir de vacas que cumplan los siguientes requisitos:

- Buen estado de salud clínica y subclínica, con especial énfasis en salud de las ubres (menos de 150000 cél/ml), libre de sustancias antimicrobianas o alimentación con antibióticos desde al menos 8 semanas antes de la recolección de leche.
- Encontrarse a mitad de su período de lactación (> 60 días y < 200 días del destete) y tener una producción superior a los 5 kg leche por día.
- Recuento bacteriológico inferior a 10^4 ufc/ml (antes del proceso de preservación: congelado, liofilización, etc.).

Para la construcción de la curva dosis-respuesta, IDF-FIL (2002) establece que deben ensayarse al menos cuatro concentraciones diferentes entre el control negativo y la concentración que se espera que sea positiva, las cuales deben estar distribuidas en forma equidistante entre ellas según una escala lineal o logarítmica. Además, debe incluirse una concentración que sea al menos 1.5 a 2 veces superior al valor positivo esperado y una concentración equivalente al LMR del antibiótico. Para cada concentración de antibiótico, deben testarse 10 a 20 réplicas cuando se efectúan calificaciones visuales, sin embargo, en caso de utilizar lectores ópticos, el número de replicas se disminuye a una cantidad comprendida entre 3 y 5.

A continuación se calcula las frecuencias relativas de resultados positivos para cada concentración de antibiótico y se construye la curva dosis-respuesta. El límite de

detección se calcula como “la concentración que corresponde a la intersección de la curva dosis respuesta con la línea que representa el 95% de resultados positivos”.

Algunos autores (Althaus *et al.*, 2002, 2003_b; Molina *et al.*, 2003_b; Montero *et al.*, 2005; Linage *et al.*, 2007) sugieren calcular el límite de detección modelando la curva “dosis-respuesta” mediante la aplicación del modelo de regresión logístico y calcular a partir de dicha curva el LD según el criterio del 95% de resultados positivos. En caso de emplearse lecturas fotométricas, el límite de detección se calcula como el valor de la concentración para el cual se alcanza el 45% de la máxima absorbancia relativa porcentual (Luitz y Suhren, 1995; Luitz *et al.*, 1995; Schliephake, 1995).

Diferentes autores (Bishop *et al.*, 1985; Müller y Jones, 1993; Charm y Ruth, 1993; Heeschen, 1993; Máyra-Makinen, 1993; Reybroek, 1994; Hozova y Greifová, 1995; Reybroek, 1995a,b; Althaus *et al.*, 2001a,b, 2002, 2003, Molina *et al.*, 2003) han estudiado los límites de detección de los diversos métodos utilizando aquellos antibióticos y sustancias quimioterapéuticas más empleadas en los tratamientos del ganado vacuno.

En los apartados siguientes se presentan los valores de los límites de detección reportados por las casa fabricantes para algunos de los métodos microbiológicos más difundidos (BRT[®] AiM, Charm Blue Yellow, Delvotest[®] y Eclipse[®]).

Método BRT[®] AiM: la Tabla I.11 muestra los límites de detección calculados para diferentes antimicrobianos en leche para el método BRT[®] AiM.

Los límites de detección indicados en dicha tabla para la penicilina y sus derivados, tales como la amoxicilina y ampicilina, están comprendidos entre los valores de 2 µg/l (Frank, 1995) y 10 µg/l (Charm y Ruth, 1993) respectivamente, mientras que las concentraciones de los restantes antibióticos betalactámicos deben hallarse a niveles comprendidos entre 5-10 µg/l en el caso de oxacilina y 70-100 µg/l para ceftiofur[®] para poder ser detectadas.

Para el caso de los aminoglucósidos, diversos autores señalan límites muy discrepantes en comparación con los reportados por la casa fabricante. Así, Zorraquino (1998) calcula 14000 µg/l para gentamicina y 15000 µg/l para neomicina, mientras que Heeschen (1993) encuentra 22000 µg/l para la neomicina y 28000 µg/l para la kanamicina.

Tabla I.11. Límites de detección ($\mu\text{g/l}$) de sustancias antimicrobianas suministrados por los fabricantes de los métodos microbiológicos

Antibiótico	LMR	DELVOTEST		BRT		ECLIPSE		CHARM BLUE YELLOW
		SP	SP-NT	BRT AiM Sin predifusion	BRT AiM LMR	50	100	
<i>Betalactámicos</i>								
Benzilpenicilina	4	2	1-2	2-3	-	4	4	3-4
Ampicilina	4	2-3	4	4	2-3	5	4	5
Amoxicilina	4	2	2-3	3-4	2-3	5	5	5-6
Oxacilina	30	5	10	10-20	5-10	25	25	-
Cloxacilina	30	15	20	20-30	10-20	40	-	30-50
Dicloxacilina	30	10	10	10-20	10-20	-	-	-
Nafcilina	30	5	-	10-15	10-15	-	-	-
Cefapirina	60	5	4-6	3-4	3-4	8	8	10
Ceftiofur	100	<50	25-50	70-100	70-100	-	-	50-100
Cefoperazona	50	40	-	-	20-30	-	-	-
Cefalexina	100	40-60	-	25-40	-	75	75	-
Cefalonio	20	5-10	-	-	-	-	-	-
Cefazolina	50	-	-	20-25	20-25	-	-	-
Cefquinoma	20	-	-	100	40-60	-	-	-
Cefacetriilo	125	20	-	-	-	-	-	-
<i>Tetraciclinas</i>								
Tetraciclina	100	100	250-	100-300	-	150	150	-
Oxitetraciclina	100	100	250-	100-300	500-750	150	100	300
Clortetraciclina	100	100-	-	-	-	-	-	-
Doxiciclina	100	-	-	-	-	-	-	-
<i>Sulfamidas</i>								
Sulfametazina	100	25	25-100	50-200	-	200	200	-
Sulfadimetoxina	100	50	-	-	-	-	-	50
Sulfatiazol	100	50	-	200-300	50-100	75	75	-
Sulfadiacina	100	50	25-50	25-50	-	-	-	-
<i>Macrólidos</i>								
Eritromicina	40	50	40-80	100	25-40	400	300	-
Espiramicina	200	200	400-600	400-800	150-200	-	1000	-
Tilmicosina	50	-	-	-	-	-	-	-
Tilosina	50	10-20	30	20-50	20-50	100	80	75-100
<i>Aminoglucósidos</i>								
Gentamicina	100	100-300	50	200-400	100-200	-	500	300-400
Neomicina	1500	100-200	100-200	400-800	300-400	-	1500	-
Kanamicina	150	2500	-	-	-	-	6000	-
DH/Estreptomina	200	300-500	-	1000-2000	750-1000	-	2500	-
<i>Quinolonas</i>								
Enrofloxacina	100	-	-	-	-	-	-	-
Flumequina	50	-	-	-	-	-	-	-
<i>Otros</i>								
Cloranfenicol	0*	2500	-	-	-	-	-	-
Trimetoprim	50	50	50-100	-	-	-	-	-
Dapsona	0*	1	0,5-1	-	-	-	-	-

*Sustancias prohibidas (Reglamento 2377/90), los límites indicados corresponden con el tiempo de viraje del control negativo (control time).

Con los macrólidos, al igual que con los aminoglucósidos, se observan diferencias entre los límites de detección calculados por los diversos autores. Por ejemplo, Charm y Ruth (1993) calculan un valor de 1000 µg/l de eritromicina en leche y Heeschen (1993) un nivel más elevado (2500 µg/l) para este macrólido.

Las tetraciclinas, según la Tabla I.11, deben estar presentes en concentraciones comprendidas entre 100 y 750 µg/l para poder detectarse. También existen marcadas diferencias en los límites calculados por los diferentes autores; Luitz y Suhren (1995a) establecen límites de 400 µg/l para la tetraciclina y oxitetraciclina, mientras que Zorraquino (1998) determina valores de 1900 y 1500 µg/l para cada las mencionadas tetraciclinas.

Los límites de detección señalados para las sulfamidas por la casa fabricante (comprendidos entre 25 µg/l y 300 µg/l, Tabla I.11) también son divergentes con respecto a los determinados por otros autores. Heeschen (1993) y Heschen y Blüthgen (1995) señalan concentraciones comprendidas entre 100 y 1000 µg/l, mientras que Zorraquino (1998) obtiene límites cercanos a los 5000 µg/l para la sulfametazina y Frank (1995) indica un rango de 15000 a 50000 µg/l para la misma sulfamida.

Estas diferencias en los límites de detección pueden atribuirse a las continuas mejoras (BRT[®] con predifusión, BRT[®] sin predifusión y BRT[®] MRL) que los fabricantes han implementado con el tiempo a fin de ajustar su método a las exigencias de las legislaciones.

Método Delvotest[®]: los límites propuestos por la casa fabricante para los métodos Delvotest[®] SP y SP-NT se resumen en la Tabla I.11. Al igual que en el caso del método BRT[®] AiM, se observan discrepancias en los valores calculados por diferentes autores en comparación con los provistos por el fabricante.

Así por ejemplo, los límites más bajos se presentan para los antibióticos betalactámicos, con valores que van desde 2.5 µg/l para la penicilina (Charm y Ruth, 1993) hasta 81 µg/l para la cloxacilina (Senyk *et al.*, 1990).

Las concentraciones de aminoglucósidos que pueden ser detectadas por el método Delvotest[®] SP varían dentro de un rango muy amplio, dependiendo del antibiótico. Charm y Ruth (1993) señalan límites de 150 µg/l de gentamicina y neomicina, mientras que Van Os y Beukers (1980) obtienen valores de 500 µg/l para la primera y un rango de 1000-2000 µg/l para la neomicina.

Los macrólidos, también presentan un amplio intervalo en sus límites de detección, al estar comprendido entre 50 µg/l para la tilosina (Honkanen-Buzalski y Reybroeck, 1995a,b,c) y 1800-2400 µg/l para la eritromicina (Senyk *et al.*, 1990).

Los límites de detección del método Delvotest® SP y SP-NT para residuos de tetraciclinas son superiores a los observados para los antibióticos betalactámicos. Mientras que Luitz *et al.* (1996) indican un límite de detección de 350 µg/l para residuos de oxitetraciclina en leche, Van Os y Beukers (1980) obtienen un rango de 700-1500 µg/l para la clortetraciclina.

Con respecto a las sulfamidas, los valores límites a detectar no están muy claros, ya que Charm y Ruth (1993) indican concentraciones superiores a las 1000 µg/l, pero no establecen un valor fijo para cada una de ellas y Luitz *et al.* (1996) calculan una concentración de 25000 µg/l para la sulfadimetoxina, superiores a los reportados por la casa fabricante.

Por otra parte, el cloranfenicol debe estar presente en la leche de vaca en concentraciones superiores (2500 µg/l) para poder ser detectado por el método Delvotest® SP. Honkanen-Buzalski y Reybroeck (1995a,b,c) indican un límite de 7500 µg/l, mientras que Senyk *et al.* (1990) observan valores comprendidos entre 16000 y 21000 µg/l en muestras de leche.

Charm Blue Yellow®: los límites de detección de este método son similares a los observados para el método BRT® AiM, en lo que respecta a betalactámicos, tetraciclinas y sulfamidas.

En un estudio reciente, Linage *et al.* (2007) evaluaron el método Blue Yellow test® en leche de oveja calculando los límites de detección de 25 sustancias antimicrobianas. Estos autores obtuvieron buenos resultados para la penicilina G, ceftiofur, framecitina, neomicina y tilosina con límites de detección inferiores y cercanos a los LMRs correspondientes. Sin embargo los límites establecidos para el resto de sustancias fueron superiores a los LMR.

Eclipse®: este método presenta buenos niveles de detección para los antibióticos betalactámicos, tetraciclinas, sulfamidas y tilosina (Tabla I.11) ya que están próximos a sus respectivos LMRs.

Montero *et al.* (2005) estudiaron los límites de detección de 27 antibióticos para el test Eclipse® 100 utilizado con muestras de leche de oveja. Los resultados indican

que el test resulta adecuado para la detección de residuos de antibióticos betalactámicos, sulfadimetoxina y sulfatiazol pero no ofrece una buena sensibilidad para la detección de residuos de antibióticos aminoglucósidos, macrólidos, tetraciclinas y quinolonas, ya que los límites establecidos son superiores a LMRs.

A modo de síntesis, se puede establecer que estos métodos de inhibición microbiológica que utilizan *G. stearothermophilus* poseen adecuados límites de detección para antibióticos betalactámicos, sulfamidas, algunas tetraciclinas, pero no son adecuados para los residuos de macrólidos (a excepción de la tilosina), aminoglucósidos y quinolonas en leche.

Con respecto a los métodos rápidos, se debe mencionar que existe una amplia variedad screening que detectan fundamentalmente residuos de betalactámicos, aunque en los últimos años se desarrollaron métodos destinadas a la identificación específica de otros antibióticos como gentamicina y enrofloxacina.

En la Tabla I.12 se exponen los límites de detección de los principales métodos rápidos diseñados para detectar residuos de antibióticos betalactámicos en la leche. Se puede establecer que, los límites de detección se ajustan a los LMRs para las penicilinas y algunas cefalosporinas, presentando niveles de detección muy bajos para cefapirina, cefoperazone, cefalexina, cefalonio, cefazolina y cefacetrilo en comparación con sus LMRs, pudiendo dar lugar a resultados “falsos violativos”.

1.3.4.2. Sensibilidad

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

En este sentido, se define a la sensibilidad de un método de cribado como la relación relativa porcentual de obtener resultados positivos al test cuando se analizan muestras de leche que poseen el fármaco a una concentración establecida por la legislación (Zeng *et al.*, 1996).

Para la determinación experimental de la sensibilidad de un método microbiológico, se deben emplear muestras de leche libres de sustancias sustancias inhibitoras, según se comentara en el apartado 1.3.4.1.

Tabla I.12. Límites de detección ($\mu\text{g/l}$) de sustancias antimicrobianas suministrados por los fabricantes de los métodos rápidos

Antibiótico	LMR	PENZYMS100	BETA STAR	Delvo XP	ROSA Charm	TETRASENSOR TWINSENSOR	SNAP	
							BL	TET
Betalactámicos								
Benzilpenicilina	4	2-4	2-4	2-4	2-3	2-3	2-3	
Ampicilina	4	3-4	2-5	4-8	2,5-4	3-5	4-6	
Amoxicilina	4	3-4	2-4	4-8	2,5-4	3-5	7-8	
Oxacilina	30	20-30	5-10	25-50	-	-	40-60	
Cloxacilina	30	30-70	5-10	30-60	25-35	6-8	30-40	
Dicloxacilina	30	-	5-10	25-50	20-30	-	20-25	
Nafcilina	30	-	8-20	-	-	30-40	70	
Cefapirina	60	3-5	-	4-8	4-8	6-8	10-12	
Ceftiofur	100	20-40	75-150	4-8	20-50	10-15	5-7	
Cefoperazona	50	-	-	-	3-6	3-4	10-15	
Cefalexina	100	15-25	-	25-50	15-30	-	20-25	
Cefalonio	20	4-8	7,5-15	3-4	3-5	-	3-5	
Cefazolina	50	-	8-16	-	8-16	-	15-20	
Cefquinoma	20	-	-	5-20	15-20	-	20	
Cefacetriilo	125	-	-	-	6-12	-	50	
Tetraciclinas								
Tetraciclina	100	-	-	-	7-15	40-50	20	
Oxitetraciclina	100	-	-	-	50-100	30-40	30	
Clortetraciclina	100	-	-	-	50-100	25-30	30	
Doxiciclina	100	-	-	-	-	10-20	-	

Fuente: Roca *et al* (2008).

Según la IDF-FIL (1997), la sensibilidad se determina mediante la preparación de 30 disoluciones patrones de una misma muestra de leche con valores de concentraciones equivalentes al LMR de cada fármaco. El cálculo se efectúa como el cociente porcentual entre el número de respuestas positivas al método, partido por el número total de determinaciones realizadas (30).

Con respecto a los métodos microbiológicos más difundidos, se puede establecer que el método Delvotest[®] SP es muy sensible a penicilina en leche de vaca, tanto para análisis efectuados con leche de tanque como para los análisis realizados con leche procedente de animales individuales (Bishop *et al.*, 1985). Así, concentraciones inferiores a 0.002 UI/ml otorgan resultados negativos, mientras que concentraciones de 0.004 y 0.005 UI/ml presentan resultados dudosos y positivos, respectivamente.

Los estudios de Mc Grane *et al.* (1996) permitieron calcular para el método Delvotest[®] SP una sensibilidad del 98% a la cloxacilina, un 100% a la sulfametazina y menos de un 50% a la tetraciclina, mientras que el método Charm[®] AIM-96 presenta una sensibilidad del 38% para la cloxacilina, 65% para la sulfametazina e inferior al

50% para la tetraciclina. Ninguno de los dos métodos presenta sensibilidad para detectar residuos de cloranfenicol y estreptomicina.

Scanella *et al.* (1997) determinaron para el método Delvotest® SP una sensibilidad del 100% para la penicilina, ampicilina y cloxacilina cuando se encuentran presentes en concentraciones de 3.6, 6, y 30 µg/l, respectivamente.

El trabajo presentado por Roca *et al.* (2007) señala que los métodos microbiológicos (BRT® AiM, Charm® Blue Yellow, CMT® Copan, Delvotest® SP-NT, Delvotest® Accelerator y Eclipse® presentan buena sensibilidad para penicilina, cloxacilina, cefoperazone (100%), amoxicilina (entre 83.3% y 100%), ampicilina (entre 70% y 100%), dicloxacilina (entre 80% y 100%), cefalexina (entre 90% y 100%), cefalonio (76.5% y 100%), pero no presentan sensibilidad para los residuos de gentamicina, oxitetraciclina.

Se debe destacar que numerosos factores afectan a la sensibilidad de los métodos de screening empleados para detectar residuos de antibióticos en leche. Así, la sensibilidad del método BRT® AiM depende de factores como la calidad y la cantidad del microorganismo de prueba presentes en el medio. Müller y Jones (1993) señalan que una mayor concentración de microorganismos hace que disminuya la sensibilidad, mientras que una disminución en su concentración produce un aumento en la sensibilidad del método.

1.3.4.3. Reproducibilidad

Para considerar como fiables a un método de cribado, resulta necesario que los resultados obtenidos en los diferentes laboratorios encargados del control de calidad resulten equivalentes.

Por este motivo, la reproducibilidad es un estudio de repetibilidad entre los resultados de análisis independientes obtenidos en equivalentes condiciones, es decir, con el mismo método sobre un material problema idéntico, realizadas en diferentes laboratorios, con diferentes técnicos, equipos de laboratorio e instalaciones (CEE, 1993).

Según la Guía 183 de IDF-FIL (2002), para realizar estudios de validación colaborativa, se deben preparar las muestras de leche (controles negativos, según se detalló en apartado 1.3.4.1) fortificadas artificialmente con diversos antibióticos

(procedentes de laboratorios certificados, especificando el grado de pureza de las sustancias patrones) para los cuales se desea validar el método.

Las muestras de leche deben enviarse acompañadas con los métodos a validar, a una cantidad mínima de 15 laboratorios. Cada muestra de leche remitida, debe ser codificada y analizada (10 a 20 réplicas) en cada laboratorio participante. Los laboratorios interviniente deben seguir un estricto protocolo experimental de trabajo suministrado por la casa fabricante.

En un trabajo realizado por Suhren y Heeschen (1994) a fin de evaluar los resultados de los métodos Charm[®] AIM-96, Delvotest[®] SP y BRT[®] AiM obtenidos en 9 laboratorios interprofesionales, procedieron a remitir muestras con diferentes concentraciones de oxitetraciclina, sulfadimidina, sulfadimetoxina, gentamicina y espiramicina. Dichos autores encuentran diferencias en la sensibilidad de los métodos debido a problemas en la estabilidad de las disoluciones patrones de las muestras de leche fortificadas. Se concluye que los métodos microbiológicos como el Delvotest[®] SP son apropiados para detectar oxitetraciclina y sulfadimidina, mientras que el método Charm[®] AIM-96 resultó muy sensible para la gentamicina.

En otro estudio colaborativo, Suhren (1995) analiza la reproducibilidad de los métodos BRT[®] AiM, Delvotest[®] SP y Penzym[®] por diferentes laboratorios lactológicos. Para ello, se enviaron disoluciones preparadas con diversas concentraciones de tetraciclinas y penicilinas en muestras de leche de vaca. El 80% de los laboratorios mostraron resultados positivos al BRT[®] AiM cuando la penicilina estaba presente en 4 µg/l, que es el valor establecido por la UE como LMR y el 100% para una concentración de 10 µg/l de este antibiótico, mientras que la tetraciclina tenía que estar presente en 1000 µg/l para que el 100% de los laboratorios pudiesen detectarla. En cuanto al método Delvotest[®] SP, el 100% de los laboratorios participantes en el ensayo colaborativo, otorgaron resultados positivos al método para concentraciones de 6 µg/l de penicilina y 1000 µg/l de tetraciclina. Respecto al método Penzym[®], el 100% de los laboratorios indicaron resultados positivos cuando las soluciones contenían 10 µg/l de penicilina (Suhren, 1995).

Moretain (1996) analizó la reproducibilidad del método enzimático Penzym[®] mediante un trabajo cooperativo con diversos laboratorios lactológicos de Francia, para lo cual utilizó muestras de leche con diferentes concentraciones de penicilina, cefalexina, oxitetraciclina, dihidroestepomicina y eritromicina.

En dicho trabajo, se concluye que el 98.7% de las muestras con concentraciones de penicilinas y cefalexina superiores a las recomendadas por la casa fabricante (2 veces LD), dieron resultados positivos y el 97% de las muestras con oxitetraciclina, dihidroestreptomicina y eritromicina presentaron resultados negativos al método, lo cual era predecible, ya que se trata de un método específico para betalactámicos.

Un estudio colaborativo realizado por Suhren y Beukers (1998) en el cual participaron 30 laboratorios pertenecientes a 17 países de Europa, evaluó la reproducibilidad del método Delvotest[®] SP para detectar residuos de cloxacilina (0, 15, 22.5, 30 y 45 µg/l) y sulfametoxazol (0, 12.5, 25, 50, 75 y 100 µg/l) en muestras de leche liofilizadas artificialmente. Los laboratorios debían realizar los análisis dentro de las tres semanas de remitidas las muestras, las cuales se enviaron debidamente refrigeradas. Las muestras fortificadas con 30 µg/l de cloxacilina (LMR) y 100 µg/l de sulfametoxazol (LMR) resultaron positivas en el 100% de los casos, mientras que las muestras con 15 µg/l (0.5 veces LMR) de cloxacilina y 50 µg/l (0.5 veces LMR) de sulfametoxazol presentaron un 52.9% y 98.6% de resultados positivos, respectivamente.

En leche de otras especies, Calhau y Barbosa (1990) evalúan los métodos Delvotest[®] P y Penzym[®] para la detección de residuos antimicrobianas en la leche cabra en el Laboratorio Lactológico INETI-DTIA (Portugal). Los resultados señalan que el 82% de las muestras analizadas por ambos métodos, presentaron los mismos resultados. El restante 18% de las muestras fueron negativas al Delvotest[®] "P" y dudosas al método Penzym[®], debido probablemente a dificultades en la interpretación visual de los resultados negativos del método Penzym[®].

En estos estudios, se debe controlar el tiempo transcurrido desde la remisión de las muestras hasta la realización de los análisis, ya que muchos analitos termolábiles podrían deteriorarse en dicho período. En efecto, moléculas termoestables, como las tetraciclinas podrían llegar a otorgar resultados negativos a concentraciones superiores al límite de detección del método.

Debe destacarse que los estudios de reproducibilidad requieren de una excelente predisposición por parte de los técnicos encargados de llevar a cabo los análisis, ya que implica dedicar un tiempo adicional al estudio, acompañado de la postergación de otras actividades propias de un laboratorio. Por ello, se llevan a cabo únicamente con personal debidamente formado y predispuesto a estas actividades.

1.3.4.4. Selectividad

La selectividad es un parámetro de gran utilidad para la evaluación de un método, ya que está asociado a la presencia de resultados “falsos positivos”. Para el cálculo de la selectividad, se debe disponer de un elevado número de muestras negativas (IDF-FIL, 2002). Según Sischo y Burns (1993), la selectividad se calcula como la frecuencia relativa porcentual entre los resultados negativos al método de screening, partido por el número total de muestras analizadas.

En este sentido, un buen método de screening debe presentar elevados valores de selectividad, es decir, un bajo porcentaje de resultados positivos, también llamados “falsos positivos”.

De igual modo, cuando se estudia el efecto que produce la adición de un determinado tipo de conservante sobre la respuesta de un método, se trata de producir la menor interferencia posible con su respuesta, o sea, la adición del conservante no debe producir resultados positivos cuando las muestras de leche estén libres de antibióticos, esto equivale a mantener la selectividad original que presentan las muestras de leche sin conservantes.

Los estudios realizados por Sischo y Burns (1993) a fin de evaluar la selectividad que presenta el método Delvotest[®] SP en muestras de leche de vaca sin medicamentos, indicaron valores elevados de este parámetro (0.950) ligeramente inferiores a las 0.976 determinado por Charm y Zomer (1995) al utilizar el mismo método también con leche de vaca.

Andrew (2000) y Charm y Zomer (1995) obtienen para el método enzimático Penzym[®] valores de selectividades de 0.910 y 0.908 respectivamente, al ser empleado con muestras de leche de vaca.

El trabajo de Roca *et al.* (2007) en España señala elevados valores de selectividades para los métodos microbiológicos BRT[®] AiM (99%), Charm[®] Blue Yellow (100%), Copan[®] CH-ATK (100%), Delvotest[®] SP (98%) y Eclipse[®] (99%). También los métodos rápidos presentaron alta especificidad para Beta[®] Star (97%), Delvo[®] XP (99%), ROSA[®] MRL BL (100%), SNAP[®] BL (100%), SNAP[®] TET (100%), Twinsensor[®] (98%) y mediana para el método Penzym[®] (82%).

1.3.4.5. Robustez

La robustez de un método analítico es la medida de su capacidad para que sus resultados no se vean afectados por pequeñas variaciones deliberadas del método. Dicho parámetro indica un indicio de su veracidad o fiabilidad durante el uso normal de un método.

Los límites de detección de los métodos, pueden verse afectados por los diferentes lotes de producción. Para evaluar estas diferencias, IDF-FIL (2002) recomienda llevar a cabo estudios para obtener información acerca de la variación en las respuestas de los métodos microbiológicos debido a diversos factores propios de la fabricación, como por ejemplo, nivel del indicador, concentración de nutrientes presentes en el medio de cultivo, concentración de esporas de microorganismos, volumen del medio de cultivo utilizado en el bioensayo, período de almacenamiento, etc. Cabe esperar que la variación en la respuesta de los métodos puede verse afectada por el período comprendido entre su fabricación y el control de cada lote de elaboración.

Otros factores inherentes al uso del método, también pueden afectar a su respuesta. Así, por ejemplo, Luitz y Suhren (1995a,b) señalan que la prolongación en el tiempo de incubación del método Delvotest[®] SP produce una disminución en la sensibilidad de algunos antimicrobianos presentes en la leche.

El tiempo de incubación también influye sobre la respuesta del método BRT[®] AiM. En efecto, en el trabajo efectuado por Molina *et al.* (1999) sobre muestras de leche de cabra conservadas con azidiol, se observó una disminución en la frecuencia relativa porcentual de casos positivos cuando el tiempo de incubación del método se prolongó desde 3.0 hasta las 4.0 horas.

Para el Delvotest[®] SP, Reybroek (1995a,b) indica que la sensibilidad es mucho más elevada cuando la lectura se realiza en el momento que se produce el cambio de color (amarillo) de la muestra testigo o “negativa”, que cuando se efectúan las interpretaciones después de un tiempo concreto de incubación (3 horas).

El período de almacenamiento de las placas del método BRT[®] AiM afecta a sus lecturas fotométricas. En efecto, Luitz y Suhren (1995a,b) observan que los límites de detección de la penicilina disminuyeron mientras que para la oxitetraciclina aumentaron conforme lo hacía el tiempo de almacenamiento (20 semanas a 6 °C).

I.4. SISTEMA MICROBIOLÓGICO MULTIPLACA (SMMP)

El principio de los Sistemas Microbiológicos Multirresiduos o Multiplaca (SMMR o SMMP) para la detección e identificación de antibióticos se basa en que, solamente se puede lograr una adecuada detección de los antibióticos, cuando se utiliza un sistema compuesto por una combinación de diferentes bacterias-test específicas para cada familia de antimicrobianos.

Las técnicas microbiológicas de cribado poseen una serie de ventajas debido a su sencillez, bajo coste y capacidad de detección. Dentro de estas técnicas de identificación preliminar de familias de antimicrobianos, se encuentran los métodos denominados "Sistemas Microbiológicos Múltiples o Multiplaca" (SMMP). Estos métodos cumplen la función de identificar los residuos de una muestra que presentó resultado "positivo" al método de screening, en alguna familia, tales como, betalactámicos, tetraciclinas, sulfamidas, aminoglucósidos, macrólidos o quinolonas.

El principio de los SMMP se basa en la difusión de los antimicrobianos contenidos en la muestra de leche (o carne) a un medio agarizado con diferentes microorganismos de prueba, medios de cultivo, condiciones de pH, temperatura de incubación y tiempo de lectura.

En los ensayos multiplacas, se utilizan placas de Petri con diferentes medios de cultivo agarizados a los cuales se les practica perforaciones de un determinado diámetro donde se coloca la muestra a analizar. En caso que la muestra de leche esté libre de antibióticos, se producirá un crecimiento bacteriano sobre la superficie de la placa, por el contrario, cuando la muestra contenga residuos de antibióticos, se formará un halo inhibitorio alrededor de la muestra que se podrá observar a simple vista como un anillo claro sin crecimiento bacteriano. En Europa, este método se utiliza ampliamente como prueba para la detección de antibióticos en carne (Nouws *et al.*, 1979; Bogaerts y Wolf, 1980, Fuselier *et al.*, 2000, Pikkemaat *et al.*, 2008).

De este modo, se logra después de un cribado previo, una clasificación del antimicrobiano, antes de pasar a una etapa de identificación y confirmación por cromatografía.

Grove y Randall (1955) desarrollaron las técnicas microbiológicas multiplaca que fueron posteriormente mejoradas por Deutchberger y Krishbaum (Kavanagh, 1989). En ellas, se estableció el uso simultáneo de diferentes placas de Petri que permitía cuantificar antibióticos en diversas matrices.

Uno de los primeros métodos oficiales fue el propuesto por van Schothorst (1969) que utilizó como bacteria-test *Sarcina lutea* para muestras de tejido de riñón. Posteriormente, en el año 1973, dicho método fue prescrito legalmente en los Países Bajos. Por su parte, Alemania presentó un método que utilizaba *B. subtilis* BGA, y otros países adoptaron similares metodologías de ensayo (Nouws *et al.*, 1979).

Mientras tanto, en Estados Unidos, Fugate (1974) empleó técnicas similares para detectar diferentes antimicrobianos en forma simultánea, mediante el empleo de múltiples placas.

Por su parte, Kavanagh (1975, 1989) destacó la importancia del uso de los métodos microbiológicos de difusión en caja de Petri con medio agarizado, valorando principalmente la posibilidad de cuantificar el antibiótico mediante curvas de calibrado que relacionan la concentración del antimicrobiano con los diámetros de los halos inhibitorios.

Otros autores han sugerido diferentes técnicas multiresiduos (FSIS, 1991) y el desarrollo de nuevos métodos microbiológicos múltiples empleados para la detección de antibióticos en productos de origen animal (Nouws *et al.*, 1999a,b; Calderón, 2001).

A continuación se presentan algunas de las características de los principales sistemas multiresiduos empleados para la detección de familias de antimicrobianos, que tuvieron sus orígenes en muestras cárnicas y posterior implementación en leche.

I.4.1. SMMP PARA LA DETECCIÓN DE RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS EN MATRICES CÁRNICAS

Los SMMR presentaron una gran evolución en el control y la identificación de residuos de agentes antimicrobianos en muestras de músculos, riñón o matrices cárnicas. Tabla I.13. resume las principales características de los SMMP, con los microorganismos de prueba, condiciones de trabajo y familias de antimicrobianos que detectan cada placa.

La Comisión Veterinaria Científica dependiente de la Comisión de la Comunidad Europea implementó la prueba denominada de cuatro placas de la Unión Europea "EU4pt" (Bogaerts y Wolf, 1980). De las cuatro placas, tres de ellas se inoculan con esporas de *B. subtilis* BGA a diferentes valores de pH (6.0, 7.2 suplementada con trimetoprim y 8.0), mientras que la cuarta placa contiene células de *Kocuria rhizophila* (*Micrococcus luteus*) ATCC 9341 a pH 8.

Tabla I.13. Características de los principales Sistemas Microbiológicos Multiplaca utilizados para la detección e identificación de residuos de antibióticos en carne

Autor	Microorganismo pH	Suplemento	Incubación	Antimicrobianos
Bogaerts y Wolf (1980)	<i>B. subtilis</i> (pH=6.0)	-	30°C – 18-24 h	Penicilinas
	<i>B. subtilis</i> (pH=7.2)	TMP	30°C – 18-24 h	Sulfamidas
	<i>B. subtilis</i> (pH=8.0)	-	30°C – 18-24 h	Estreptomicina
	<i>K. rhizophila</i> (pH=8.0)	-	37°C – 18-24 h	Estreptomicina
Ferrini et al. (1997)	<i>B. subtilis</i> (pH=6.0)	-	30°C – 18-24 h	Betalactámicos
	<i>B. subtilis</i> (pH=7.2)	TMP	30°C – 18-24 h	Sulfamidas
	<i>B. subtilis</i> (pH=8.0)	-	30°C – 18-24 h	Aminoglucósidos
	<i>B. cereus</i> (pH=5.9)	-	30°C – 18-24 h	Tetraciclinas
Okerman et al. (1998)	<i>B. subtilis</i> (pH=6.0)	-	30°C – 18-24 h	Betalactámicos
	<i>B. subtilis</i> (pH=7.2)	TMP	30°C – 18-24 h	Sulfamidas
	<i>B. subtilis</i> (pH=8.0)	-	30°C – 18-24 h	Aminoglucósidos
	<i>K. rhizophila</i> (pH=8.0)	-	37°C – 18-24 h	Macrolidos
	<i>E. coli</i> (pH=6.0)	-	30°C – 18-24 h	Quinolonas
Myllyniemi et al. (2000)	<i>B. cereus</i> (pH=6.5)	-	30°C – 20 h	Tetraciclinas
	<i>Staphylococcus</i> (pH=7.2)	-	37°C – 20 h	Eritromicina
	<i>K. rhizophila</i> (pH=8.0)	-	37°C – 20 h	Macrólidos
	<i>S. epidermis</i> (pH=6.0)	-	37°C – 20 h	Lincomisina
	<i>B. subtilis</i> (pH=6.0)	PENASA	30°C - 20 h	Betalactámicos
	<i>B. subtilis</i> (pH=7.2)	TMP	30°C - 20 h	Sulfaminas
	<i>B. subtilis</i> (pH=6.0)	-	30°C - 20 h	Estreptomicina
	<i>E. coli</i> (pH=7.2)	-	30°C – 20 h	Quinolonas
Fuselier et al. (2000)	<i>B. subtilis</i> (pH=7.2)	-	30°C – 18-24 h	Aminoglucósidos
	<i>K. rhizophila</i> (pH=8.0)	-	37°C – 18-24 h	Macrolidos
	<i>B. cereus</i> (pH=6.0)	-	30°C – 20 h	Tetraciclinas
	<i>G. stearothermophilus</i>	TMP	55°C – 16-18 h	Sulfamidas
	<i>E. coli</i> (pH=6.0)	-	30°C – 18-24 h	Betalactámicos
Okerman et al. (2001)	<i>B. subtilis</i> (pH=6.0)	-	30°C – 18-24 h	Quinolonas
	<i>K. rhizophila</i> (pH=6.0)	-	37°C – 18-24 h	Betalactámicos
	<i>E. coli</i> (pH=6.0)	-	30°C – 18-24 h	Quinolonas
	<i>B. cereus</i> (pH=6.0)	-	30°C – 18-24 h	Tetraciclinas
Myllyniemi et al. (2001)	<i>B. subtilis</i> (pH=6.0)	PENASA	30°C – 18-24 h	Betalactámicos
	<i>B. subtilis</i> (pH=7.2)	TMP	30°C – 18-24 h	Sulfamidas
	<i>B. cereus</i> (pH=6.5)	-	30°C – 18-24 h	Tetraciclinas
	<i>E. coli</i> (pH=7.2)	-	30°C – 18-24 h	Quinolonas
	<i>K. rhizophila</i> (pH=6.0)	-	37°C – 18-24 h	Inespecifico
	<i>K. rhizophila</i> (pH=8.0)	-	37°C – 18-24 h	Inespecifico
Calderon (2001)	<i>S epidermidis</i> 12228	-	30°C – 16-18 h	Neomicina
				Gentamicina
	<i>B. cereus</i> (pH=6.5)	-	30°C – 18-24 h	Tetraciclinas
	<i>B. subtilis</i> (pH=8.0)	-	30°C – 18-24 h	Aminoglucósidos
	<i>K. rhizophila</i> 9341a	-	37°C – 18-24 h	Eritromicina
	<i>K. rhizophila</i> 15957	-	37°C – 18-24 h	Estreptomicina
	<i>K. rhizophila</i> 9341a	PENASA	37°C – 18-24 h	Betalactámicos
<i>E. coli</i> (pH=6.0)	-	30°C – 18-24 h	Quinolonas	

Tabla I.13.(cont). Características de los principales Sistemas Microbiológicos Multiplaca utilizados para la detección e identificación de residuos de antibióticos en carne

Autor	Microorganismo pH	Suplemento	Incubación	Antimicrobianos
USDA (2007)	<i>S epidermidis</i> 12228	-	30°C – 18-24 h	Eritromicina
	<i>B. cereus</i> (pH=4.5)	PENASA	30°C – 18-24 h	Tetraciclinas
	<i>B. subtilis</i> (pH=8.0)	PENASA	30°C – 18-24 h	Estreptomicina
	<i>K. rhizophila</i> 9341 a	-	37°C – 18-24 h	Betalactámicos
	<i>K. rhizophila</i> 9341 a	PENASA	37°C – 18-24 h	Betalactámicos (confirmación)
	<i>K. rhizophila</i> 9341 a	PENASA	37°C – 18-24 h	Eritromicina (confirmación)
Pikkemaat <i>et al.</i> (2008)	<i>K. rhizophila</i> 15957	-	37°C – 18-24 h	Aminoglucósidos
	<i>B. subtilis</i> (pH=8.0)	-	30°C – 16-18 h	Aminoglucósidos
	<i>K. rhizophila</i> (pH=8.0)	-	37°C – 16-18 h	Betalactámicos
	<i>B. pumilus</i> (pH=7.0)	TMP	37°C – 16-18 h	Macrólidos
	<i>Y. ruckeri</i> (pH=6.5)	-	30°C – 16-18 h	Sulfamidas
	<i>B. cereus</i> (pH=6.0)	-	30°C – 16-18h	Quinolonas
				Tetraciclinas

El “EU4pt” fue desarrollado para la detección de residuos en carne y no resultó apropiado para su uso en riñón, debido a que presentaba un elevado número de resultados “falsos positivos”. Por ello, en diversos países del mundo, se plantearon alternativas en la preparación de las placas (Koenen-Dierick y De Beer, 1998; Nouws *et al.*, 1988). Por ejemplo, se propuso un método en base a *B. subtilis* que se puede implementar en matrices como la pelvis renal o riñón fluido, puesto que los niveles de residuos en estos órganos son generalmente superiores a los obtenidos en carne. Esta situación, mejora la sensibilidad de la prueba (Nouws *et al.*, 1988). Como reforma, Nolan *et al.* (2000) propusieron el uso de una membrana entre la muestra de riñón y el medio amarizado de la placa de Petri a fin de evitar problemas con los inhibidores naturales presentes en la muestra.

El Manual de Material de Referencia y Métodos de Oxford (UK) del año 1994 propone un sistema microbiológico que utiliza 5 placas de Petri para la detección e identificación de 5 familias de antimicrobianos en tejido de origen animal. Las placas contienen *B. subtilis* BGA pH= 6.0 (penicilinas y tetraciclinas), *B. subtilis* BGA pH= 7.2 con trimetoprim (sulfamidas), *B. subtilis* BGA pH= 8.0 (aminoglucósidos), *K. rhizophila* ATCC 9341 pH= 8.0 (macrólido y lincosamidas), *Escherichia coli* ATCC-11303 pH= 6.0 (quinolonas). La validación de este sistema microbiológico efectuada por Okerman *et al.* (1998) señala que las placas de sulfamidas y aminoglucósidos no permiten detectar niveles de sulfadimidina y estreptomicina próximos a sus LMRs. Únicamente los betalactámicos, las tetraciclinas y las quinolonas son detectadas a niveles similares a sus LMRs.

Currie *et al.* (1998) analizan 66 drogas mediante el sistema de 4 placas de la CEE y determinan la variación entre placas, destacando que el método posee sensibilidad para betalactámicos, tetraciclinas, quinolonas, macrólidos y lincosamidas, siendo menos sensibles para anticoccidianos y nitrofuranos en músculos procedentes de 1830 muestras de inspecciones de carnes de rutina.

Por otro lado, Ferrini *et al.* (1997) sugieren un sistema constituido por 4 sistemas de dos placas de Petri cada uno, que contienen microorganismos sensibles con el agregado de sustancias sinérgicas o antagónicas. La "Placa 1" contiene *B. subtilis* BGA pH= 7.2 con trimetoprim (Placa 1A) y ácido para-aminobenzoico (Placa 1B) para la detección de sulfamida. La "Placa 2" compuesta por *B. subtilis* BGA pH= 8.0 con cisteína (Placa 2A) y *B. subtilis* BGA pH= 8.0 sin cisteína (Placa 2B) para detectar estreptomina. La "Placa 3" permite detectar antibióticos betalactámicos mediante *B. subtilis* BGA pH= 6.0 sin penicilinas (Placa 3A) y *B. subtilis* BGA pH= 6.0 con penicilinas (Placa 3B). Por último la "Placa 4" para la detección de tetraciclinas contiene *B. cereus* ATCC-11778 a pH= 5.9 (Placa 4A) y *B. cereus* K-250 a pH= 6.0 (Placa 4B). Este método presenta ventajas en términos de costos, practicidad y cantidad de muestras a procesar, aunque el tiempo en obtener las respuestas es elevado (de 18 a 24 horas).

Myllyniemi *et al.* (2000) exponen un estudio interesante al emplear un método de dos placas que utilizan *B. subtilis* pH 7.2, con y sin el suplemento de trimetoprim (TMP) en el medio de cultivo. En dicho estudio se analizaron muestras de riñón y músculo procedentes de animales tratados con antibióticos, que fueron sacrificados durante el período de retiro. De un total de 89 muestras analizadas, 68 contenían residuos de penicilina, oxitetraciclina y enrofloxacin a niveles superiores e inferiores a sus LMRs. Se concluye que el método con *B. subtilis* logra detectar únicamente residuos de penicilina en tejido muscular. Además, dichos autores destacan que los costos de la etapa de confirmación pueden reducirse considerablemente mediante la implementación de un sistema microbiológico de identificación preliminar.

En virtud de la Directiva 96/23/CEE (CEE, 1996) del Consejo de la Unión Europea, la "Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments" (AFSSA, Fougères, Francia) fue designada como laboratorio comunitario de referencia (LCR) para analizar (entre otras) las sustancias B1 (CEE, 1996). El LCR propone un método de detección de antibióticos mejorado que se denomina "STAR" (Screening Test for Antibiotic Residues) para matrices cárnicas (Fuselier *et al.*, 2000; Gaudin *et al.*, 2004)

Este sistema emplea cinco placas inoculadas con *B. cereus* (tetraciclinas), *G. stearothermophilus* (betalactámicos), *B. subtilis* (sulfamidas y aminoglucósidos), *K. rhizophila* (macrólidos) y *E. coli* (quinolonas) como bacterias-test. Los resultados obtenidos en un estudio colaborativo con un pequeño número de residuos en músculo de cerdo fueron satisfactorios, aunque gentamicina no se logró detectar inclusive a un nivel de 5 veces el LMR y la placa de *G. stearothermophilus* mostró inhibición con muestras blanco, es decir resultados “falsos positivos” (Fuselier *et al.*, 2000).

Posteriormente, Okerman *et al.* (2001) presentan un test de inhibición para la detección e identificación presuntiva de tetraciclinas, betalactámicos y quinolonas en aves de corral. El método propuesto consta de tres placas a pH=6, inoculadas con *B. cereus*, *K. rhizophila* y *E. coli*. Dichos autores, obtienen límites de detección más bajos para un número limitado de residuos cuando emplean el sistema de tres placas en comparación con los hallados por un método que utiliza *B. subtilis* a pH=6. Sin embargo, éste método presenta un espectro limitado, ya que no detecta aminoglucósidos, sulfonamidas y macrólidos.

En Finlandia, Myllyniemi *et al.* (2001) sugieren un sistema constituido por seis placas de Petri que incluyen tres microorganismos a diferentes valores de pH, con la incorporación de sustancias sinérgicas o inhibitoras. Las placas contienen *B. cereus* ATCC 11778 pH= 6.55 (tetraciclinas), *B. subtilis* BGA pH= 7.2 con trimetoprim (sulfamidas), *B. subtilis* BGA pH= 6.0 con la adición de penicilinas (penicilina), *K. rhizophila* ATCC 15957 pH= 8.0 (macrólidos), *K. rhizophila* ATCC 15957 pH= 6.0 (aminoglucósidos) y *E. coli* ATCC-11303 pH= 8.0 (quinolonas). Este sistema muestra una identificación fehaciente que puede ser utilizada como un instrumento útil en la caracterización preliminar de residuos de antibióticos en tejidos animales.

En España, el método desarrollado como técnica de identificación preliminar del sistema múltiple en el Instituto de Salud Carlos III (Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid) se emplea para detectar residuos de antimicrobianos en muestras de tejidos animales (Calderón, 2001). Dicha técnica microbiológica de difusión utiliza 6 placas de Petri con diferentes medios de cultivo, que se inoculan con 5 microorganismos: *B. cereus* ATCC 11778 pH= 4.5 (tetraciclinas), *K. rhizophila* pH= 6.0 ATCC 9341a (betalactámicos y macrólidos), *B. subtilis* ATCC 6633 pH= 8.0 (sulfamidas), *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 pH= 8.0 (aminoglucósidos) y *E. coli* ATCC 11303 pH= 8.0 (quinolonas), específicos para diferentes familias de antimicrobianos. Resulta importante destacar que en esta técnica, emplea además las enzimas betalactamasa y cefalosporinasa con el objeto de mejorar la especificidad para la detección de penicilinas y cefalosporinas.

Por su parte, el laboratorio Nacional de Referencia (Centro Nacional de Alimentación-Agencia Española de Seguridad Alimentaria-CNA-AESA, Madrid), propone la técnica de “cinco placas”, basada en la modificación del sistema “EEC Four Plate Test” (sistema de 4 placas) recomendado por Bogaerts y Wolf (1980). Este sistema fue propuesto por el Comité Científico Veterinario de las comunidades europeas como un método de cribado de residuos de antibióticos en carne.

Calderón *et al.* (2003) describen que el sistema de cinco placas de Petri utiliza: *B. subtilis* BGA pH= 6.0 (tetraciclinas), *B. subtilis* BGA pH= 7.2 (sulfonamidas), *B. subtilis* BGA pH= 8.0 (aminoglucósidos), *K. rhizophila* ATCC 9341 pH= 6.0 (betalactámicos y macrólidos) y *E. coli* ATCC 11303 a pH= 8.0 (quinolonas). Por lo general, cada placa es específica para un determinado grupo de antimicrobianos, pero en ocasiones, la inhibición del crecimiento bacteriano de una placa puede deberse a la interferencia que ocasiona un residuo procedente de otra familia, especialmente cuando el nivel de antibiótico es alto. En este sentido el sistema presenta problemas de “especificidad cruzada”. Únicamente las sulfamidas causan inhibición casi exclusiva en la placa con *B. subtilis* a pH 7.2 debido a la adición de trimetoprim.

La posibilidad de realizar una identificación preliminar de residuos de antibióticos en carnes fue explorada por la Seguridad Alimentaria de USA (USDA-FSIS, 2007). Para ello proponen un sistema de siete placas, que fue implementado por USDA-FSIS como un procedimiento microbiológico de confirmación de muestras que resultaron positivas a las pruebas de cribado iniciales tales como “Swab Test on Premises” STOP (Jhonston *et al.*, 1981), “Calf Antibiotic and Sulfa Test” CAST (Dey *et al.*, 2005a) y “Fast Antibiotic Screening Test” FAST (Dey *et al.*, 2005b).

Este método emplea *K. rhizophila* ATCC 9341 y *K. rhizophila* ATCC 15957 (resistentes a eritromicina y dihidro-estreptomicina), las cuales mejoran la identificación de los macrólidos y aminoglucósidos. El método carece de una placa suplementada con TMP, motivo por el cual no resulta suficiente para la detección de sulfonamidas. La placa que contiene *B. subtilis* permite una adecuada detección de enrofloxacin, sin embargo, la falta de una placa específica para esta familia de antibióticos, no permite su detección específica.

El método denominado “Test de Antibiótico Nouws” (NAT) (Pikkemaat *al et.*, 2008) constituye un sistema de detección de antimicrobianos aplicado para líquidos extraídos de pelvis renal (Tabla I.13, *cont.*). Este SMMP se compone de cinco placas de Petri específicas para diferentes familias de antibióticos: En el caso que una placa muestre una zona de inhibición mayor a un cierto valor, dicha placa revela la identidad

del grupo antimicrobiano. A diferencia de otros test, los extractos de tejidos se aplican en perforaciones realizadas en el agar, mejorando de este modo la sensibilidad del método en detrimento de la robustez.

En forma similar, se desarrollaron métodos postscreening para el análisis de antibióticos en riñón y carne (Pikkemaat *et al.*, 2009_{a,b}) que se utilizan en animales de faena dentro del marco del Programa Nacional de Vigilancia en los Países Bajos. Se puede concluir que, en la medida que se aumenta el número de placas específicas necesarias para lograr una detección más adecuada, la elaboración de los métodos se torna más laboriosa. Sin embargo, estos sistemas brindan la ventaja de mejorar la identificación presuntiva de grupos de antibióticos, permitiendo reducir los costos y esfuerzos en las etapas de confirmación de estas sustancias.

1.4.2. SMMP PARA LA DETECCIÓN DE RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS EN LECHE

Existen diversos sistemas que resultan de la implementación de bioensayos específicos para cada familia de antibiótico. Dichos sistemas se pueden utilizar para la semi-cuantificación de antimicrobianos por difusión en caja de Petri con medios agarizados. Algunos de los SMMP más destacados en la bibliografía se detallan a continuación.

En primer lugar, se debe mencionar el sistema descrito por “Association Official Analytical Chemists” (AOAC, 1984), que se basa en la utilización de un elevado número de placas y un sistema de corrección de resultados de los halos inhibitorios, que logra disminuir la variabilidad producida entre las diferentes placas. Esta técnica resulta poco práctica para el análisis rutinario de residuos de antibióticos en alimentos, ya que demanda un elevado tiempo en la preparación de las placas, la medición de los halos inhibitorios y el análisis de los resultados. Por ello, no resulta sencillo de implementarlo en un laboratorio como un sistema de rutina para el control de residuos.

Brady y Katz (1987) describen un sistema simplificado de “3 placas” donde utilizan tres cepas de microorganismo sensibles a distintos grupos de antimicrobianos: *B. cereus* ATCC 11778 (tetraciclinas), *B. subtilis* ATCC 6633 (aminoglucósidos) y *Micrococcus flavus* (bacitracina). Este diseño es comparable en exactitud y precisión al descrito por la AOAC (1984) y resulta más simple para el análisis de residuos en leche y carne.

Además, el boletín de la IDF N° 258 (IDF-FIL, 1991) publica un sistema de “3 placas” que se basa en ensayos de discos. En una placa se inocula *G. stearothermophilus* var. *calidolactis* (betalactámicos, e incluso tetraciclinas), en otra *B. subtilis* BGA (aminoglucósidos y macrólidos) y en la tercera *B. megaterium* ATCC-9885 (cloranfenicol y sulfonamidas).

En forma casi simultánea, Federación Internacional de Lechería describe un sistema microbiológico compuesto por “6 placas de Petri” (IDF-FIL, 1991). Las muestras de leche se colocan en perforaciones cilíndricas realizadas en el agar. Las placas contienen medios de cultivos específicos y 6 microorganismos de prueba: *B. cereus* ATCC-11778 (tetraciclinas), *B. subtilis* BGA a pH= 6.0 (sulfamidas), *B. subtilis* BGA a pH= 8.0 (aminoglucósidos), *K. rhizophila* ATCC 9341 (macrólidos), *E. coli* ATCC-11303 (quinolonas) y *G. stearothermophilus* (betalactámicos). Cada placa se incuba en condiciones de pH, temperatura y tiempos diferentes. La presencia de halos inhibitorios con un incremento en el diámetro de inhibición de más de 1 mm alrededor de las perforaciones efectuadas en las placas de Petri, revelan la presencia de un antibiótico en la placa específica.

Un método de características similares se emplea en el Laboratorio Nacional de Referencia Francés dependiente de la Agencia Francesa de Seguridad Sanitaria de los Alimentos (AFSSA, 1990). Es la técnica oficial para la detección de antibióticos y sulfonamidas en leche destinada a la alimentación humana o animal. Este método, contempla una primera etapa de cribado, basada en una técnica de acidificación que utiliza *S. thermophilus* en lugar del *G. stearothermophilus*. Posteriormente se procede a implementar un sistema microbiológico de confirmación que consta de 3 placas de Petri. Estas placas se inoculan en medios de cultivos específicos que contienen *G. stearothermophilus* (penicilinas y tetraciclinas), *B. subtilis* ATCC 6633 (aminoglucósidos y macrólidos) y *B. megaterium* ATCC 9885 (sulfonamidas y cloranfenicol). Después de transcurrido un tiempo de 15 a 24 horas, se consideran positivas aquellas muestras que presentan un diámetro superior a 10 mm en al menos una de las placas de Petri.

El “Instituto para la calidad de los productos alimentarios” del Ministerio de Agricultura holandés (Rijks-Kwaliteitsinstituut voor lan-en tuinbouw-produkten, RIKILT-DLO) desarrolló un Sistema Microbiológico Multirresiduo (Nouws *et al.*, 1998, 1999a, b), para la leche. Este método emplea 6 ó 7 placas de Petri conteniendo diferentes medios de cultivo inoculados con distintos microorganismos de prueba (bacteria-test) específicos para cada grupo de agentes antimicrobianos.

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

El SMMP descrito por Nouws *et al.* (1998, 1999a,b) consta de 6 placas de Petri con diferentes microorganismos en formas esporuladas o vegetativas. Tabla I.14 resume concentración, composición, pH de los medios, temperatura y tiempo de incubación de cada placa para la detección de los diferentes tipos de residuos que pueden encontrarse en la leche. La elección de cada microorganismo, se ha realizado en función de la sensibilidad que presenta la bacteria frente al residuo a detectar.

Tabla I.14. Características del Sistema Microbiológico Multiplaca propuesto por Nouws

Microorganismo	Medio de cultivo	pH	T(°C)-Tiempo (h)	Antimicrobianos
<i>G. stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i> C953 10 ⁵ esp/mL	PCA	8.0	55-6	Betalactámicos
<i>B. subtilis</i> BGA 10 ⁴ esporas	PCA	8.0	30/16-18	Aminoglucosidos
<i>K. rhizophila</i> ATCC 9341 10 ⁶ ufc /ml	MH	8.0	30/16-18	Macrolidos
<i>E. coli</i> ATCC 11303 10 ⁶ ufc /mL	PCA + ET	6.0	30/16-18	Quinolonas
<i>B. cereus</i> var. <i>mycoides</i> ATCC11778 10 ⁵ esporas /mL	STD II + KH ₂ PO ₄	6.0	30/16-18	Tetraciclinas
<i>B. subtilis</i> BGA 10 ⁴ esporas /mL	MH + S + TMP	7.0	37/16-18	Sulfamidas

Fuente: PCA: Plate count agar, MH: Mueller Hinton agar, STD II: Standar II Nähragar, ET: Extracto de carne, S: sangre; TMP: trimetoprim. Fuente: Nouws *et al.* (1999a,b).

La Tabla I.15 muestra las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) obtenidas por Nouws *et al.* (1998, 1999a,b) para disoluciones de leche fortificadas con diferentes niveles de antibióticos. Se aprecia que la mayoría de las CMI obtenidas para los antibióticos ensayados (betalactámicos, tetraciclinas, sulfonamidas, macrólidos, aminoglucósidos, quinolonas y otros) son menores que los LMR establecidos por la UE. Todo ello indica que, el SMMP posee una gran capacidad para detectar la mayoría de los residuos que provienen de distintos grupos de antimicrobianos en matrices como leche de vaca cruda, leche deshidratada, preparada para consumo humano o leche de otras especies como oveja (Althaus *et al.*, 2009).

Tabla I.15. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del SMMP propuesto por Nouws

Antimicrobiano	CMI	LMR-UE	Antimicrobiano	CMI	LMR-UE
<i>Betalactámicos</i>			<i>Macrólidos</i>		
Penicilina	2	4	Eritromicina	10	40
Ampicilina	2	4	Espiramicina	75	200
Amoxicilina	3	4	Tilmicosina	6	50
Cloxacilina	15	30	Tilosina	100	50
Dicloxacilina	15	30	<i>Aminoglucósidos</i>		
Oxacilina	20	30	Gentamicina	25	100
Cefacefrilo	15	125	Neomicina	50	500
Cefalexina	45	100	Kanamicina	150	-
Cefalonium	10	20	DH/Estreptomicina	100	200
Cefoperazona	30	50	<i>Quinolonas</i>		
Ceftiofur	30	100	Enrofloxacin	4	100
Cefquinoma	80	20	Flumequina	150	-
Cefapirina	5	10	Marbofloxacin	5	75
Cefazolin	10	50	Danofloxacin	-	30
<i>Tetraciclinas</i>			<i>Varios</i>		
Clortetraciclina	10	100	Novobiocina	25	50
Oxitetraciclina	30	100	Baqueloprim	20	30
Tetraciclina	30	100	Dapsona	1	0
<i>Sulfonamidas</i>			Trimetoprim	50	50
Sulfametazina	40	100	Rifamicina	60	-
Sulfadiazina	30	100	Colistina	100	50
Sulfadimetoxina	20	100			

Unidades: µg/l. Fuente: Nouws *et al.* (1999a,b)

Nouws *et al.* (1999a,b) destacan que la placa de Petri que utiliza *B. cereus* presenta una gran especificidad para detectar tetraciclinas y la que contienen *E. coli* detecta quinolonas, mientras que los macrólidos son identificados con *K. rhizophila*. Por el contrario, la placa de *G. stearothermophilus* presenta interferencias con algunos aminoglucósidos. Del mismo modo, la placa que emplea *B. subtilis* (específica para sulfonamidas) muestra especificidades cruzadas con otras familias de antimicrobianos.

Por todo ello, Nouws *et al.* (1998, 1999_{a,b}) proponen el empleo de pruebas posteriores de confirmación, tales como los ensayos de la penicilinas (PENASA), del ácido para-aminobenzoico (PABA) o sus combinaciones con técnicas cromatográficas.

En forma casi simultánea, Fuselier *et al.* (1999) y Gaudin *et al.* (2001) proponen el sistema STAR como método postcribado para la detección e identificación de residuos de antibióticos en leche. Este sistema consta de 5 placas de Petri (Tabla I.16) que contienen los siguientes microorganismos: *B. subtilis* BGA (sulfamidas), *K. varians* (macrólidos), *B. cereus* (tetraciclinas), *E. coli* (quinolonas) y *G. stearothermophilus* (betalactámicos). La validación del método STAR (Tabla I.17) efectuada por Gaudin *et al.* (2004), permite concluir que se trata de un método económico que mejora la

detección de quinolonas, tetraciclinas y macrólidos con respecto a otros sistemas multirresiduos, aunque los tiempos de respuestas son lentos (15 - 24 horas).

Tabla I.16. Características del Sistema Microbiológico Multiplaca propuesto por Fuselier y Maris

Microorganismo	Medio de cultivo	pH	T(°C)-Tiempo (h)	Antimicrobianos
<i>G. stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i> ATCC 10149 5.10 ⁵ esp/mL	DST+ TMP	7.4	55/12-15	Betalactámicos + Sulfamidas
<i>B. subtilis</i> BGA 5.10 ⁴ esporas	Test agar	7.2	30/16-18	Aminoglucósidos
<i>K. varians</i> ATCC 9341 5.10 ⁴ ufc /mL	Test agar	8.0	37/18-24	Macrólidos
<i>E. coli</i> ATCC 11303 10 ⁵ ufc /mL	Test agar	8.0	37/18-24	Quinolonas
<i>B. cereus</i> var. <i>mycoides</i> ATCC11778 3.10 ⁴ esp/mL	Test agar	6.0	30/16-18	Tetraciclinas

DST: Diagnostic Sensitive Test TMP: trimetoprim. Fuente: Fuselier y Maris (1999).

Tabla I.17. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del SMMP propuesto por Fuselier y Maris (1999)

Antimicrobiano	CMI	LMR-UE	Antimicrobiano	CMI	LMR-UE
<i>Betalactámicos</i>			<i>Macrólidos</i>		
Penicilina	12-16	4	Eritromicina	30	40
Ampicilina	5-6	4	Espiramicina	300	200
Amoxicilina	16	4	Tilmicosina	50	50
Cloxacilina	50	30	Tilosina	200	50
Dicloxacilina	12	30	<i>Aminoglucósidos</i>		
Oxacilina	30	30	Gentamicina	300	100
Cefacetrilo	50	125	Neomicina	1500	1500
Cefalexina	25-30	100	Kanamicina	1000	-
Cefalonium	150	20	Estreptomina	1000	200
Ceftiofur	125	100	<i>Quinolonas</i>		
Cefquinoma	15	20	Enrofloxacin	20	100
Cefapirina	400	10	Flumequina	900	-
Cefazolin	200	50	Marbofloxacin	30	75
<i>Tetraciclinas</i>			Danofloxacin	15	30
Clortetraciclina	50	100	<i>Sulfonamidas</i>		
Doxiciclina	75	-	Sulfametacina	600	100
Oxitetraciclina	250	100	Sulfadiacina	100	100
Tetraciclina	250	100	Sulfadimetoxina	175	100

Unidades: µg/l, Fuente: Gaudin *et al.* (2004).

Por su parte, Tsai y Kondo (2001) evaluaron los niveles de detección de 31 agentes antimicrobianos sobre diversas combinaciones de 7 bacterias-test y 5 medios de cultivos diferentes (Tabla I.18). Dentro de las bacterias empleadas se incluyeron algunas poco frecuentes como *Clostridium perfringens* y *Photobacterium phosphoreum*. El microorganismo *B. cereus* fue incluido en el estudio, pero no se consideró apropiado, ya que la utilización de *B. subtilis* en medio mínimo mostró mejor sensibilidad a tetraciclinas (oxitetraciclina y clortetraciclina).

Tabla I.18. Características del Sistema Microbiológico Multiplaca (SMMP) propuesto por Tsai y Kondo

Microorganismo	Medio de cultivo	pH	T(°C)-Tiempo (h)	Antimicrobianos
<i>G. stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i> C953 1.10 ⁶ ufc/mL	SAM	7.0	55-18	Betalactámicos
<i>B. subtilis</i> BGA 1.10 ⁶ ufc/mL	MM	6.0	30/16-18	Tetraciclinas
<i>K. rhizophila</i> ATCC 9341 1.10 ⁶ ufc/mL	MH	8.0	37/16-18	Macrolidos
<i>E. coli</i> ATCC 27166 1.10 ⁶ ufc/mL	MM	6.0	37/16-18	Quinolonas
<i>B. subtilis</i> BGA 1.10 ⁶ ufc/mL	MHA	8.0	30/16-18	Aminoglucósidos
<i>B. subtilis</i> BGA 1.10 ⁶ ufc/mL	MM + TMP	7.2	30/16-18	Sulfamidas

SAM: Sintetic assay Medium; MM: Minimum medium; MHA: Mueller Hinton agar; TMP: trimetoprim. Fuente: Tsai y Kondo (2001) .

Las CMI's calculadas para cada placa específica se resumen en Tabla I.19. Los antibióticos betalactámicos se detectan específicamente mediante la placa que contiene *G. stearothermophilus* (Medio Sintético de Ensayo), los aminoglucósidos son identificados por *B. subtilis* (Müller Hinton), las quinolonas con *E.coli* (MHA), las tetraciclinas con *B. subtilis* (Medio Mínimo) y los aminoglucósidos con *K. varians* (Mueller Hinton).

A modo de síntesis, Tsai y Kondo (2001) proponen el uso de cuatro placas específicas con *G. stearothermophilus* en medio SAM (Sintetic Assay Medium), *B. subtilis* en MM (Medio Mínimo), *K. varians* en MHA (Mueller Hinton) y *E. coli* 27166 en MM (Medio Mínimo) para una detección adecuada de residuos de agentes antimicrobianos.

Tabla I.19. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del SMMP propuesto por Tsai y Kondo

Antimicrobiano	CMI	LMR-UE	Antimicrobiano	CMI	LMR-UE
<i>Betalactámicos</i>			<i>Quinolonas</i>		
Penicilina	6	4	Ác. oxolínico	100	-
Ampicilina	50	4	Ác. nalixídico	6250	-
<i>Tetraciclínas</i>			<i>Macrólidos</i>		
Clortetraciclina	100	100	Eritromicina	390	40
Oxitetraciclina	200	100	Tilosina	50	50
<i>Sulfonamidas</i>			<i>Aminoglucósidos</i>		
Sulfametazina	12500	100	Gentamicina	780	100
Sulfadiazina	3120	100	Kanamicina	780	150
Sulfadimetoxina	780	100	Estreptomicina	1560	200
Sulfaquinixalina	780	100	DH/Estreptomicina	1560	200
Sulfametizole	6250	100			

Unidades: µg/l. Fuente: Tsai y Kondo (2001).

1.4.3. CARACTERÍSTICAS DE LOS SMMP PARA SU IMPLEMENTACIÓN EN EL CONTROL DE RESIDUOS

Los Sistemas Microbiológicos Multiplacas presentan ciertas ventajas con respecto a algunos métodos de screening y a las técnicas cromatográficas. Por una parte, resultan económicos en el momento de implementarse en un laboratorio de control de calidad de residuos, ya que sus insumos tienen un bajo costo (medios de cultivos, microorganismos, material descartable, etc.). Por otra parte, estos sistemas se caracterizan por otorgar buenos resultados, ya que las concentraciones mínimas inhibitorias resultan similares, y en algunos casos inferiores a los LMRs (Nouws *et al.*, 1999a,b; Fuselier *et al.*, 2000; Tsai y Kondo, 2001). Ambas ventajas hacen que, la relación “costo-beneficio” de estos sistemas sea muy buena. Por este motivo, en los últimos años, se han desarrollado una gran variedad de sistemas destinados a la detección e identificación de numerosas familias de residuos, tanto en carne, como en leche y otras matrices de origen animal (Pikkemaat *et al.*, 2009_{a,b}).

Sin embargo, estas virtudes se opacan en el momento de aplicar estos SMMP en un laboratorio de control de residuos, ya que la elaboración de las palcas es una tarea laboriosa y poco práctica para su implementación como una técnica de análisis rutinario. En efecto, las placas de Petri deben prepararse en forma periódica, ya que no se pueden conservar refrigeradas a 4°C por tiempos prolongados. Además, requieren de personal capacitado para trabajar con material microbiológico, a diferencia de los métodos comerciales de inhibición microbiológica que no demandan de experiencia previa por parte del usuario.

En lo que respecta a los resultados, estos sistemas microbiológicos son lentos, puesto que las respuestas se obtienen transcurridas 18 o 24 horas luego de iniciado el análisis y muchas veces, la industria demanda respuestas más rápidas a la problemática que ocasiona la presencia de residuos en la leche.

Además, la “especificidad cruzada” constituye otro inconveniente que no llega a estar totalmente resuelto en los diseños y en las validaciones de los SMMP. Los problemas de interferencias debido a moléculas que, no perteneciendo a una familia de antimicrobiano determinada, producen halos inhibitorios en otras placas diferentes a las cuales deberían identificarse (especificidad cruzada), no llega a estar totalmente resuelto. Escasos estudios sobre este tema (Nouws *et al.*, 1999a,b; Althaus *et al.*, 2009) se llevan a cabo a concentraciones fijas de antibióticos y los resultados pueden llevar a conclusiones erróneas.

Por ejemplo, Nouws *et al.* (1999a,b) señalan que las tetraciclinas se detectan únicamente en la placa que contiene *B. cereus* cuando utilizan muestras de leche fortificadas con 500 µg/l de tetraciclina y que no existen problemas de interferencias cruzadas con las 5 placas restantes del SMMP propuesto. Sin embargo, Althaus *et al.* (2009) al utilizar el mismo SMMP con muestras de leche de oveja, observan interferencias para 450 µg/l de tetraciclina y 750 µg/l de oxitetraciclina en la placa que contiene *G. stearothermophilus*. Por ello, los estudios de especificidad cruzada deberían ser más completos y presentarse en forma más simples.

En virtud de los inconvenientes que presentan los actuales SMMP, una alternativa novedosa consiste en desarrollar Sistemas Microbiológicos en microplacas (SMmp) que empleen diferentes microorganismos esporulados específicos para cada familia de antibióticos, que brinden una respuesta dicotómica (“positivo” o “negativo”) cuando los residuos se encuentran a niveles cercanos a sus LMRs, en un tiempo breve (inferior a las 6.0 horas).

De este modo, los laboratorios encargados del control de residuos en la leche, podrán disponer de un sistema multirresiduo económico, práctico, simple, que para su uso no requiere personal capacitado en microbiología, y que pueda suministrarse comercialmente.

Objetivos

II. OBJETIVOS

Debido a los inconvenientes prácticos que presentan los actuales Sistemas Microbiológicos Multirresiduos (SMMR) en placas de Petri que se utilizan para la detección e identificación de residuos de antimicrobianos en la leche, se planificó abordar el estudio de Sistemas Microbiológicos en microplacas (SMmps) como un instrumento alternativo para el control de residuos en la leche.

Por ello, el objetivo general del presente trabajo ha sido proponer una estrategia analítica basada en un Sistema Microbiológico en microplacas haciendo uso de las técnicas del diseño experimental aplicadas a bioensayos de respuestas dicotómicas, que permita identificar residuos de antibióticos pertenecientes al menos a tres familias, en un tiempo inferior a las 6 horas.

Para el logro de este propósito, se han planteado el diseño de dos Sistemas Microbiológicos en microplacas y la elección del sistema más adecuado, con objetivos específicos para cada uno de ellos, los cuales se detallan a continuación.

ESTUDIO 1. DISEÑO, OPTIMIZACIÓN Y VALIDACIÓN DEL SMmp1

Debido a que *Geobacillus stearothermophilus* es sensible a los antibióticos betalactámicos y brinda una respuesta en un tiempo breve (comprendido entre 3 y 4 horas), se consideró interesante potenciar este microorganismo mediante la adición de sustancias antimicrobianas específicas, a fin de mejorar su sensibilidad para la detección de otros agentes antimicrobianos, como por ejemplo las tetraciclinas (Bioensayo “BT”) y sulfamidas (Bioensayo “BS”).

De este modo, mediante el empleo simultáneo de dos bioensayos potenciados, se pretende lograr una identificación de residuos de antibióticos betalactámicos, tetraciclinas y sulfamidas en la leche. Para el diseño de este Sistema Microbiológico en Microplacas (SMmp1) se contemplaron los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluar los efectos de los principales “factores de diseño” y “factores de ruido” que afectan a la respuesta de un bioensayo para la detección de residuos de penicilina en leche.
2. Mejorar la sensibilidad del bioensayo que utiliza *G. stearothermophilus* para la detección de residuos de tetraciclinas en la leche (Bioensayo “BT”),

mediante la incorporación de cloranfenicol en el medio de cultivo, de modo tal de aproximar sus límites de detección a sus LMRs.

3. Optimizar los límites de detección de del bioensayo que utiliza *G. stearothermophilus* para la detección de residuos de sulfamidas (Bioensayo “BS”) en la leche, empleando niveles adecuados de trimetoprim en el medio de cultivo, a fin de aproximarlos a sus LMRs
4. Validar el Sistema Microbiológico en microplacas (SMmp1) mediante los estudios de límites de detección y especificidad cruzada para otros agentes antimicrobianos.

ESTUDIO 2. DISEÑO, OPTIMIZACIÓN Y VALIDACIÓN DEL SMmp2

En este trabajo se contempló el diseño, la optimización y la validación de un Sistema Microbiológico en microplacas que consiste en tres bioensayos que utilizan bacterias-test específicas para cada familia de antimicrobianos. Para ello se utilizaron *G. stearothermophilus* (Bioensayo “B”: betalactámicos), *B. cereus* (Bioensayo “T”: tetraciclinas) y *B. subtilis* (Bioensayo “S”: sulfamidas). Los objetivos propuestos para esta etapa son los siguientes:

1. Optimizar un Bioensayo “B” que utiliza *G. stearothermophilus* para la identificación específica de residuos de betalactámicos a niveles similares a sus LMRs, de modo tal que no presente especificidad cruzada con las tetraciclinas.
2. Diseñar y optimizar un Bioensayo “T” que emplee *B. cereus* como bacteria-test para detectar residuos de tetraciclinas en la leche a niveles próximos a sus LMRs en un tiempo inferior a 6 horas.
3. Elaborar un Bioensayo “S” con *B. subtilis* para la detección de residuos de sulfamidas en leche a niveles cercanos a sus LMRs, que brinde una respuesta en un tiempo de 6 horas, aproximadamente.
4. Validar el Sistema Microbiológico en microplacas (SMmp2) a través de los estudios de especificidad cruzada y límites de detección para otros agentes antimicrobianos.

ESTUDIO 3. PROPUESTA DE UNA ESTRATEGIA ANALÍTICA PARA UNA MEJOR DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS EN LA LECHE

Un adecuado sistema microbiológico para la “*detección*” de residuos de antibióticos en la leche, además de presentar apropiados niveles de detección para los diversos antimicrobianos, debe ser capaz de detectar la mayor cantidad posible de moléculas que se emplean en el tratamiento de las diferentes patologías del ganado vacuno lechero, utilizando una mínima cantidad de bioensayos.

Además, cuando se propone una estrategia analítica para lograr una adecuada “*identificación*” de residuos de antibióticos en la leche, se persigue un doble propósito, por una parte, optimizar cada bioensayo (o combinaciones de bioensayos) de modo tal que resulte específico para una familia de antibióticos, con límites de detección cercanos a los Límites Máximos de Residuos, y por otra parte, evitar los inconvenientes de especificidad cruzada a fin de disminuir los problemas asociados a la interpretación de los resultados.

Por todo ello, mediante el presente estudio se persiguen los siguientes objetivos:

1. Recomendar un Sistema Microbiológico en microplacas que permita “*detectar*” en la leche, la mayor cantidad de antibióticos utilizados en el tratamiento del ganado vacuno a niveles cercanos a sus Límites Máximos de Residuos, haciendo uso de un mínimo número de bioensayos.
2. Proponer un Sistema Microbiológico en microplacas que sea capaz de “*identificar*” residuos de antibióticos en la leche pertenecientes al menos a tres familias, con niveles de detección cercanos a los Límites Máximos de residuos.

Material y Métodos

III. MATERIALES Y MÉTODOS

En este trabajo se llevan a cabo tres estudios, los dos primeros de tipo experimental y el último de carácter descriptivo-comparativo. En la primera etapa se utilizó *G. stearothermophilus* como bacteria-test del SMmp1, mientras que en el segundo experimento se emplearon los microorganismos *G. stearothermophilus*, *B. cereus* y *B. subtilis* para el SMmp2. Cada uno de estos estudios posee diseños experimentales acordes a los objetivos propuestos. El último apartado sintetiza la información de ellos a fin de recomendar aquellos bioensayos que permiten “*detectar*” e “*identificar*” la mayor cantidad de moléculas que se utilizan en los diferentes tratamientos del ganado vacuno productor de leche. Los materiales de trabajo y diseños experimentales se describen a continuación.

III.1. MATERIALES

III.1.1. EQUIPOS, REACTIVOS Y MATERIAL DE LABORATORIO

Los equipos utilizados para la elaboración de los bioensayos fueron los que se indican a continuación:

- ✓ Balanza analítica de precisión 0.0001 g (Scientech SA120, USA)
- ✓ Balanza sensibilidad 0.001 g (Scientech SP150, USA)
- ✓ Agitador magnético (Cole-Parmer Instrument Company USA, Model 4803-02)
- ✓ Baño termostático (Dalvo Model MAI4, Argentina)
- ✓ pHmetro con controlador de temperatura (Orion, Model 410A)
- ✓ Autoclave vertical tipo chamberland (Tecnología Científica, Argentina)
- ✓ Campana de flujo laminar (Sabella FVL-1300, Argentina)
- ✓ Estufa de cultivo (Hornos Eléctricos O.R.L.[®], Argentina)
- ✓ Centrífuga de 2500 rpm (Rolco, Modelo 2036, Argentina)

Los reactivos de trabajo empleados en la preparación de los bioensayos fueron:

- ✓ MnSO₄ H₂O (N° 1440, Lote 727665, UCB[®], Bruselas, Bélgica)

- ✓ Cloranfenicol (Sigma Aldrich[®], Ref. C0378)
- ✓ Trimetoprim (Sigma Aldrich[®], Ref. T7883)
- ✓ Negro Brillante BN (Sigma Aldrich[®], Ref. 211842)
- ✓ Púrpura de bromocresol (Mallinckrodt[®], USA, Ref. 2090)
- ✓ Rojo fenol (Cicarelli[®], Argentina, Ref. 1103201)
- ✓ NaOH (Cicarelli[®], Argentina, Ref 893214)
- ✓ HCl 36.5% (Cicarelli[®], Argentina, Ref. 918110)
- ✓ Medio de cultivo Plate Count Agar (PCA, Difco[®], Ref. 247940)
- ✓ Medio de cultivo Muller Hinton Agar (MH, Merck[®], Ref.105437)
- ✓ Caldo nutritivo (Britania[®], Ref. B0100605)
- ✓ Agar nutritivo (Britania[®], Ref. B0212205)
- ✓ Glucosa (Anhedra[®], Argentina, Ref 6837)
- ✓ Solución fisiológica (Anhedra[®], Argentina, Ref 7169)

Los materiales de laboratorio fueron:

- ✓ Microplacas ELISA estériles de fondo "U" Deltalab[®] (España).
- ✓ Micropipetas automáticas regulables de 10 µl, 50 µl, 200 µl y 1000 µl marca Boeco[®] (Alemania)
- ✓ Dosificador electrónico repetitivo multicanal (8 canales) Eppendorf Research[®] Pro (Alemania)
- ✓ Frascos de vidrio de borosilicato autoclavables Boeco[®] (Alemania)
- ✓ Tubos falcon para centrifuga de 50 ml Biologix (Argentina)

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

III.1.2. SUSPENSIONES BACTERIANAS

Para la elaboración de los bioensayos se emplearon como bacteria-test los microorganismos:

- ✓ Suspensión de esporas de *G. stearothermophilus* var. *calidolactis* C953, (Merck[®], Ref. 1.11499) contenida en ampollas de vidrio.
- ✓ Suspensión de esporas de *B. subtilis* BGA (Merck[®], Ref. 1.10649) contenida en ampollas de vidrio.
- ✓ Cepa de *B. cereus* var. *mycoides* ATCC 11778 procedente de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), liofilizada y contenida en ampolla de vidrio.

III.1.2.1. Preparación de suspensiones bacterianas

Se procedió a preparar suspensiones bacterianas a partir de cepa liofilizada (*B. cereus*) o de suspensiones de esporas comerciales (*G. stearothermophilus*, *B. subtilis*), de modo tal de obtener suspensiones de concentraciones de esporas perfectamente cuantificadas. Para ello, se siguieron las siguientes etapas:

1. *Recuperación del cultivo liofilizado (B. cereus)*. Para recuperar este cultivo, se abrió la ampolla mediante una lima en un equipo de flujo laminar. Luego, se procedió a rehidratar la cepa añadiendo 1 ml de caldo nutritivo con una pipeta Pasteur y resuspendiendo todo el conjunto. A continuación, se mantuvo en estufa a $37\pm 1^\circ\text{C}$ durante 30 minutos.
2. *Preparación del medio de esporulación*. Se utilizó como medio de esporulación agar nutriente con 31.3 mg de $\text{MnSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ por litro. Se esterilizó en autoclave a $120\pm 1^\circ\text{C}$ durante 15 minutos. Una vez estéril se dosificó en cantidades de 75 ml en placas de 140 mm de diámetro.
3. *Cultivo y esporulación*. Se tomó un volumen de 0.5 ml de suspensión inicial (recuperada del cultivo liofilizado o procedente de ampollas comerciales) y se sembró con asa en superficie, en las placas con el medio de esporulación anteriormente preparado. Seguidamente se incubó a los tiempos y temperaturas detallados en la Tabla III.1.

Tabla III.1. Condiciones de esporulación y pasteurización de las bacterias-test

Microorganismo	Condiciones esporulación		Condiciones pasteurización	
	Temperatura (°C)	Tiempo (h)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
<i>G. stearothermophilus</i>	64±1	48	80±2	10
<i>B. cereus</i>	30±1	24	65±2	30
<i>B. subtilis</i>	30±1	24	65±2	30

4. *Recolección de las esporas.* Las esporas obtenidas se recogieron de la superficie de agar mediante la ayuda de una espátula, pipeta Pasteur y solución fisiológica (0.85% NaCl). La operación se repitió hasta obtener un volumen de 15 ml de suspensión bacteriana por placa, aproximadamente.

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

6. *Lavados.* Las suspensiones bacterianas se distribuyeron en tubos de 10 ml, que fueron centrifugados a 3000 g durante 10 minutos. A continuación, se eliminaron los sobrenadantes y se resuspendieron los sedimentos utilizando solución fisiológica, y centrifugando nuevamente. Esta operación se repitió 3 veces.

7. *Pasteurización.* Con el objeto de mantener suspensiones bacterianas estables a lo largo del tiempo, se calentaron los tubos de vidrio que contenían dichas suspensiones según las condiciones de tiempo y temperatura de pasteurización detalladas en la Tabla III.1. Una vez enfriados los tubos, se mantuvieron en heladera a 4°C protegidos de la desecación y la deshidratación.

8. *Recuento y ajuste de la concentración de esporas.* Las suspensiones de esporas obtenidas se contaron mediante la técnica de recuento de microorganismos en placas de Petri. Para ello, se efectuaron sucesivas diluciones seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7}) con solución fisiológica. Posteriormente, y debido a que las suspensiones de esporas se encontraban a una concentración superior a la de trabajo, se prepararon nuevas disoluciones de esporas ajustadas a 10^9 esporas/ml. Esta operación se llevó a cabo re-diluyendo las suspensiones iniciales con solución fisiológica.

9. *Conservación.* Una vez ajustadas las concentraciones de las suspensiones, se mantuvieron en refrigeración (4°C) durante un período de al menos un año, efectuando controles de viabilidad con una frecuencia de tres meses.

III.1.3. PREPARACIÓN Y CONSERVACIÓN DE LOS BIOENSAYOS

La Tabla III.2. muestra los microorganismos utilizados en la elaboración de los diferentes bioensayos. Así, *G. stearothermophilus* está indicado para la detección de residuos de antibióticos betalactámicos (Bioensayo “B”), pero también se lo emplea para la detección de residuos de tetraciclinas mediante la incorporación de cloranfenicol (Bioensayo “BT”) o sulfamidas con el agregado de trimetoprim (Bioensayo “BS”). *B. cereus* es el microorganismo que se considera más sensible para la detección de residuos de tetraciclinas (Bioensayo “T”) y *B. subtilis* para la detección de sulfamidas (Bioensayo “S”).

Tabla III.2. Composición de los medios de cultivos y características de elaboración de los bioensayos que componen SMmp1 y SMmp2

Bioensayos	Microorganismo	Medio	pH	Indicador	Suplemento
<i>SMmp1</i>					
Bioensayo “BT”	<i>G. stearothermophilus</i>	PCA	7.2±0.1	PBC	CAP
Bioensayo “BS”	<i>G. stearothermophilus</i>	M-H	8.2±0.1	NB-AT	TMP
<i>SMmp2</i>					
Bioensayo “B”	<i>G. stearothermophilus</i>	M-H	8.0±0.1	NB-AT	-
Bioensayo “T”	<i>B. cereus</i>	PCA	7.2±0.1	PBC-RF	CAP
Bioensayo “S”	<i>B. subtilis</i>	M-H	7.0±0.1	TTZ-AT	TMP

PCA: Plate count agar, M-H: Mueller Hinton, PBC: púrpura de bromocresol, NB: negro brillante, AT: azul de toluidina, RF: rojo fenol, TTZ: trifeniltetrazolium, CAP: cloranfenicol, TMP: trimetoprim.

En primer lugar, se prepararon los medios de cultivo según los bioensayos (Tabla III.2) a elaborar, los cuales fueron enriquecidos con glucosa a niveles que se indican en cada experimento. Los medios se disolvieron en caliente y con permanente agitación, para facilitar el proceso de disolución. Una vez disueltos en su totalidad, se esterilizaron en un autoclave, a 120±1 °C durante 15 minutos. A continuación se atemperaron a 50°C con ayuda de una plancha calefactora y se ajustaron los valores el pH según el caso (Tabla III.2).

Una vez preparados los medios de cultivos, se procedió a la inoculación con suspensiones de esporas del microorganismo correspondiente (Tabla III.2). Además se agregaron los indicadores púrpura de bromocresol (Bioensayo “BT”), negro brillante - azul de toluidina (Bioensayo “BS” y Bioensayo “B”), púrpura de bromocresol - rojo

fenol (Bioensayo "T") y trifeniltetrazolium - azul de toluidina (Bioensayo "S") en condiciones estériles. Las concentraciones se detallan en cada experimento.

Una vez inoculados, los frascos conteniendo los medios de cultivo se mantuvieron en agitación a temperatura de $50\pm 1^{\circ}\text{C}$ mientras se llenaron las microplacas con un dispensador electrónico repetitivo de ocho canales Eppendorf Research[®] Pro. Cuando se finalizó de elaborar las microplacas, se dejaron atemperar en el flujo laminar y se sellaron con bandas aluminizadas de poliestireno con ayuda de plancha calefactora a $180\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 3 segundos. Las microplacas se conservaron en heladera a una temperatura de 4°C hasta el momento de su uso.

III.1.4. ESTUDIOS DE SELECTIVIDAD

Para el estudio de la selectividad se utilizó muestras de leche procedentes de 192 animales individuales que no fueron medicamentados ni recibieron alimentación con fármacos (IDF-FIL, 2002). Los animales provenían de una explotación ganadera productora de leche del Departamento Las Colonias (Santa Fe, Argentina).

Las muestras de leche presentaban una composición química y valores de pH, considerados normales para leche de vacuna en Argentina, así como recuentos de células somáticas (RCS < 400000 células/ml) y cantidad bacteriológica (CFU < 100000 ufc/ml) adecuados.

Además, las muestras fueron analizadas por duplicado mediante el método Copan[®] test (CH-ATK) microplate P&S (Chr Hansen, Hoersholm, Denmark), para poder comparar los resultados de la selectividad con los calculados para los bioensayos elaborados según los diferentes diseños experimentales.

La selectividad para cada bioensayo se calculó como la frecuencia relativa porcentual de resultados negativos, haciendo uso de la siguiente expresión:

$$\text{"Selectividad"} = \text{"(resultados negativos/muestras totales analizadas)*100"}$$

III.1.5. DISOLUCIONES DE FÁRMACOS Y MUESTRAS FORTIFICADAS

Para el cálculo de los límites de detección de los diferentes bioensayos, se utilizaron 30 agentes antimicrobianos (10 betalactámicos, 4 aminoglucósidos, 4 macrólidos, 4 quinolonas, 3 tetraciclinas y 5 sulfonamidas) empleados en los tratamientos veterinarios del ganado vacuno, que se detallan en la Tabla III.3.

Tabla III.3. Antibióticos utilizados en el diseño y validación de los bioensayos

Antibiótico	Solubilidad	Marca	Código	Fórmula
<i>Betalactámicos</i>				
Penicilina G	H ₂ O	Sigma	PEN-Na	C ₁₆ H ₁₇ N ₂ O ₄ SNa
Amoxicilina	H ₂ O	Sigma	A-8523	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₅ S
Ampicilina	H ₂ O	Sigma	A-9518	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₄ S
Cloxacilina	H ₂ O	Sigma	C-9393	C ₁₉ H ₁₇ ClN ₃ O ₅ SNa
Oxacilina	H ₂ O	Sigma	O-1002	C ₁₉ H ₁₈ N ₃ O ₅ SNa.H ₂ O
Cefadroxil	H ₂ O	Sigma	C-7020	C ₁₆ H ₁₇ N ₃ O ₅ S
Cefalexina	H ₂ O	Sigma	C-4895	C ₁₆ H ₁₇ N ₃ O ₄ S
Cefoperazone	H ₂ O	Sigma	C-4292	C ₂₅ H ₂₆ N ₉ O ₈ S ₂ Na
Cefuroxime	H ₂ O	Sigma	C-4417	C ₁₉ H ₁₇ N ₅ O ₇ S ₃
Ceftiofur [®]	H ₂ O	Pharmacia & Upjohn ^a		C ₁₆ H ₁₅ N ₄ O ₈ SNa
<i>Aminogluicósidos</i>				
Gentamicina	H ₂ O	Sigma	G-3632	C ₂₁ H ₄₃ N ₅ O ₇
Kanamicina	H ₂ O	Sigma	K-4000	C ₁₉ H ₃₆ N ₄ O ₁₁ .H ₂ SO ₄
Neomicina	Fosfato pH=8	Sigma	N-1876	C ₂₃ H ₄₆ N ₆ O ₁₃ .3H ₂ SO ₄
Estreptomocina	H ₂ O	Sigma	S-6501	(C ₂₁ H ₃₉ N ₇ O ₁₂) ₂ .3H ₂ SO ₄
<i>Macrolidos</i>				
Eritromicina	Metanol	Sigma	E-6376	C ₃₇ H ₆₇ NO ₁₃
Espiramicina	Fosfato pH=8	Sigma	S-9136	C ₄₃ H ₇₄ N ₂ O ₁₄
Lincosamina	Metanol	Sigma	L-6004	C ₁₈ H ₃₄ N ₂ O ₈ .HCl
Tilosina	Metanol	Sigma	T-6134	C ₄₆ H ₇₇ NO ₁₇
<i>Quinolonas</i>				
Ciprofloxacina	NaOH 0.1 N	Fluka	17850-F	C ₁₇ H ₁₈ F ₃ N ₃ O ₃
Enrofloxacin	NaOH 0.1 N	Bayer ^b	-	C ₁₉ H ₂₂ FN ₃ O ₃
Marbofloxacina	NaOH 0.1 N	Vetoquinol ^c	-	C ₁₇ H ₁₉ FN ₄ O ₄
Norfloxacina	NaOH 0.1 N	Sigma	N-9890	C ₁₆ H ₁₈ FN ₃ O ₃
<i>Sulfamidas</i>				
Sulfatiazol	H ₂ O	Sigma	S-0127	C ₉ H ₈ N ₃ NaO ₂ S ₂
Sulfametoxazol	H ₂ O	Sigma	S-7507	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₃ S
Sulfadimetoxina	H ₂ O	Sigma	S-7385	C ₁₂ H ₁₃ N ₄ NaO ₄ S
Sulfametazina	Metanol	Sigma	S-5637	C ₁₂ H ₁₃ N ₄ O ₂ SNa
Sulfadiazina	Metanol	Sigma	S-8626	C ₁₀ H ₁₀ N ₄ O ₂ S
<i>Tetraciclinas</i>				
Clortetraciclina	NaOH 0.1 N	Sigma	C-4881	C ₂₂ H ₂₃ ClN ₂ O ₈ .HCl
Oxitetraciclina	HCl 0.1 N	Sigma	O-5750	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₉ .HCl
Tetraciclina	HCl 0.1 N	Sigma	T-3258	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈ .HCl

^a Pharmacia & Upjohn Co., Kalamazoo, MI, USA; ^b Bayer Health Care Div. Animal Health, Monheim, Germany; ^c Vetoquinol SA - B.P. 189 - 70204 Lure cedex, France.

En el estudio de los límites de detección de estos fármacos, se prepararon disoluciones en el momento de efectuar los análisis, que fueron utilizadas dentro de las dos horas posteriores a su elaboración, a fin de evitar cualquier desvanecimiento debido al tiempo y/o por la acción de la luz.

Para la preparación de las diluciones se pesó en una balanza analítica, 0.0100 g de cada sustancia (teniendo en cuenta la pureza informada por el fabricante), y se disolvió en un matraz de 10 ml utilizando el disolvente más adecuado para cada sustancia (Tabla III.3). De esta manera se obtuvieron las disoluciones madre o “stock” con una concentración de 1000 mg/l. A partir de esta “disolución stock” de cada antibiótico se prepararon disoluciones que correspondían 100, 10 y 1 mg/l.

Las muestras fortificadas de leche, se prepararon en matraces aforados de 10 ml. Para cada caso se tomó, con ayuda de una micropipeta, la cantidad necesaria de las disoluciones de antibiótico preparadas anteriormente (100, 10 y 1 mg/l, “stock”), siguiendo las recomendaciones de la IDF-FIL (IDF-FIL, 1999, 2002), donde se indica que el volumen de las disoluciones empleadas para fortificar a las muestras de leche no debe superar el 1% del volumen de disolución final.

Para la preparación de las disoluciones de leche se utilizó leche libre de antibióticos obtenida a partir de animales individuales, no tratados con medicamentos durante el experimento (Reichmuth *et al.*, 1997; IDF-FIL, 1999, 2002).

De cada uno de los fármacos, se prepararon 12 disoluciones (1 blanco de muestra de leche sin la adición de antibiótico y 11 concentraciones de los antibióticos estudiados). Las concentraciones empleadas varían para los diferentes bioensayos y se detallan en apartados siguientes.

III.1.6. ESTUDIO DE LOS LÍMITES DE DETECCIÓN

Para el estudio de los límites de detección de cada agente antimicrobiano, se emplearon dos microplacas (16 réplicas de cada concentración) por cada unidad experimental de los diseños específicos utilizado en la etapa de optimización o validación.

En cada pocillo de la microplaca, se depositó 50 μ l de disolución de leche previamente enriquecida con el antibiótico a estudiar. Seguidamente, las microplacas del SMmp1 se colocaron 1 hora a 4°C para que tenga lugar la difusión de los antibióticos desde la leche hacia el medio agarizado. A continuación, la leche se retiró

de cada pocillo por lavado de las microplacas con agua destilada, repitiendo esta operación tres veces. Las microplacas se sellaron con bandas adhesivas y se colocaron a incubar en baño flotante de agua a temperaturas y tiempos señalados en cada experimento. Las microplacas del SMmp2 no tuvieron predifusión de los antibióticos y directamente se sellaron con bandas adhesivas y se depositaron en baño de agua flotante respetando las temperaturas y tiempos de cada experimento.

III.1.7. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los residuos de antibióticos presentes en las muestras de leche, reducen o inhiben el desarrollo microbiano y por lo tanto la actividad fermentativa de la bacteria-test. Por ello, tanto los procesos de acidificación debido a su actividad metabólica, como los procesos oxidativos, se ven disminuidos, acompañados de la persistencia del color original del indicador presente en el método. Por el contrario, cuando la leche está libre de residuos de antibióticos, tienen lugar los procesos metabólicos, acompañados de la producción de ácido y de la capacidad oxidativa de las bacterias test. En tal situación, se producen cambios en los valores de pH y/o potenciales redox del medio de cultivo, acompañado de cambios en la coloración de los indicadores ácido-base o redox, según corresponda.

Las interpretaciones visuales de los bioensayos se llevaron a cabo por tres personas calificadas y entrenadas para lecturas de variables dicotómicas en términos de “negativo” (viraje del color original del indicador) o “positivo” (conservación del color original del indicador). Las calificaciones dudosas (colores intermedios) fueron consideradas como “positivas” al método (Suhren *et al.*, 1996).

La Tabla III.4. resume los diversos indicadores ácidos-bases, redox o sus combinaciones, utilizados en la elaboración de los diferentes métodos. Se muestran además los colores que presentan cada bioensayo clasificados según la respuesta (“positivo” o “negativo”).

III.1.8. CÁLCULO DE LOS LÍMITES DE DETECCIÓN DE LOS BIOENSAYOS

Para los diferentes diseños experimentales utilizados en la optimización y validación de los bioensayos, se calcularon los límites de detección (LDs) como la concentración de antibiótico que produce un 95% de resultados positivos en la curva

dosis-respuesta construida con datos dicotómicos (Suhren y Heeschen 1993; Reichmuth *et al.*, 1997; Suhren *et al.*, 1997; Sternesjo y Johsson, 1998; IDF-FIL, 1997, 2002; Althaus *et al.*, 2002).

Tabla III.4. Indicadores utilizados en los SMmp y colores clasificados según sus respuestas

SMmp	Tipo indicador	Indicadores	Color	
			Negativo	Positivo
<i>SMmp1</i>				
Bioensayo "BT"	Ácido-Base	PBC	Amarillo	Púrpura
Bioensayo "BS"	Redox	NB-AT	Amarillo	Negro
<i>SMmp2</i>				
Bioensayo "B"	Redox	NB-AT	Amarillo	Negro
Bioensayo "T"	Ácido-Base	RF-PBC	Amarillo	Rojo
Bioensayo "S"	Redox	TTZ-AT	Rosado	Azul

PBC: púrpura de bromocresol, NB: negro brillante, AT: azul de toluidina, RF: rojo fenol, TTZ: trifeniltetrazolium.

Para ello, se utilizó el modelo de regresión logístico del paquete estadístico SAS® (SAS, 2001). Además, para cada diseño experimental se calculó el coeficiente de concordancia como un parámetro que indicado el ajuste logrado entre las frecuencias reales de las curvas dosis-respuestas y las frecuencias estimadas por el modelo logístico, lo que se detalla en el apartado de análisis estadístico.

III. 2. DISEÑO, OPTIMIZACIÓN Y VALIDACIÓN DEL SMmp1 (*Geobacillus stearothermophilus*)

Para el diseño, la optimización y la validación del SMmp1 se llevaron a cabo 4 experimentos. En una primera etapa se evaluaron los efectos de "factores de diseño" y "factores de ruido" que mayor repercusión pueden presentar sobre la curva dosis-respuesta de la penicilina "G" en el bioensayo.

En una segunda etapa se diseñó un Bioensayo "BT" que permita detectar residuos de antibióticos betalactámicos y tetraciclinas, mientras que el tercer experimento se diseñó otro Bioensayo "BS" para la detección de betalactámicos y

sulfamidas. Finalmente, se llevaron a cabo estudios de especificidad para evaluar las respuestas del SMmp1 frente a diferentes familias de antimicrobianos en leche.

III.2.1. DISEÑO ROBUSTO DE UN BIOENSAYO PARA LA DETECCIÓN DE PENICILINA "G" EN LA LECHE

El presente experimento persigue como finalidad analizar los principales factores que afectan a la respuesta de un bioensayo de inhibición microbiológica y determinar la magnitud de cada efecto. Para ello, se ha propuesto un diseño robusto que contempla el análisis simultáneo de "factores de diseño" y "factores de ruido".

Un diseño robusto $2^3 \times 2^2$ con dos réplicas (64 microplacas ELISA) se utilizó para optimizar un bioensayo capaz de detectar residuos de penicilinas en leche con una adecuada sensibilidad. Para cada una de las condiciones del diseño, se elaboraron dos microplacas ELISA.

La Tabla III.5 resume los niveles de los tres "factores de control" (FC) contemplados en el diseño del bioensayo: Concentración de esporas (E), Concentración del indicador (I), Volumen del medio de cultivo (V) y los dos "factores de ruido" (FR) atribuidos a la variabilidad en las condiciones operativas del usuario: Tiempo de difusión (Td) de los agentes antimicrobianos presentes en la leche y tiempo de incubación (Ti) de los bioensayos a $64 \pm 1^\circ\text{C}$.

Tabla III.5. Niveles de los diferentes factores empleados en el diseño experimental

Factores	Bajo nivel (-)	Alto nivel (+)
<i>Factores de control</i>		
E: Concentración de esporas (esporas/ml)	$0.5 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^5$
I: Concentración del indicador (mg/l)	25	50
V: Volumen del medio de cultivo (μl)	100	120
<i>Factores de ruido</i>		
Td: Tiempo de difusión a 4°C (min)	60	90
Ti: Tiempo de incubación $64 \pm 1^\circ\text{C}$ (h)	3.0	4.0

III.2.1.1. Preparación del bioensayo

Se utilizó medio de cultivo PCA (Tabla III.2) enriquecido con 20 g/l de glucosa, que se fraccionó en cuatro alícuotas ("A", "B", "C" y "D") a fin de elaborar los

bioensayos contemplados en el diseño experimental. A cada alícuota, se agregó una suspensión de "E" (*G. stearothermophilus*) y una disolución de indicador ácido-base (púrpura de bromocresol, SIGMA B-5880), de modo tal de obtener los niveles de la Tabla III.5 ("A", E: $0.5 \cdot 10^5$ esporas/ml - I: 25 mg/l; "B", E: $0.5 \cdot 10^5$ esporas/ml - I: 50 mg/l; "C", E: $2.0 \cdot 10^5$ esporas/ml - I: 25 mg/l y "D", E: $2.0 \cdot 10^5$ esporas/ml - I: 50 mg/l).

La Tabla III.6 resume las combinaciones de los niveles de cada factor utilizado en el diseño factorial $2^3 \times 2^2$ con dos réplicas. De acuerdo con el diseño, a partir de cada alícuota ("A", "B", "C" y "D") se llenaron ocho microplacas con 100 μ l de medio de cultivo por cada pocillo, mientras que las ocho restantes microplacas ELISA fueron llevadas con 120 μ l por cada pocillo (16 microplacas por cada alícuota).

De esta forma, los efectos del tiempo de difusión (Td) y tiempo de incubación (Ti) se analizaron (Td: 60' - Ti: 3h; Td: 60' - Ti: 4h; Td: 90' - Ti: 3h; Td: 90' - Ti: 4h), tal como se observa en la matriz de diseño de la Tabla III.6.

Tabla III.6. Matriz del Diseño Experimental Robusto $2^3 \times 2^2$

Unidad Experimental	Factores de control			Factores de ruido		Unidad Experimental	Factores de control			Factores de ruido	
	E	I	V	Td	Ti		E	I	V	Td	Ti
1	-	-	-	-	-	17	+	-	-	-	-
2	-	-	-	-	+	18	+	-	-	-	+
3	-	-	-	+	-	19	+	-	-	+	-
4	-	-	-	+	+	20	+	-	-	+	+
5	-	-	+	-	-	21	+	-	+	-	-
6	-	-	+	-	+	22	+	-	+	-	+
7	-	-	+	+	-	23	+	-	+	+	-
8	-	-	+	+	+	24	+	-	+	+	+
9	-	+	-	-	-	25	+	+	-	-	-
10	-	+	-	-	+	26	+	+	-	-	+
11	-	+	-	+	-	27	+	+	-	+	-
12	-	+	-	+	+	28	+	+	-	+	+
13	-	+	+	-	-	29	+	+	+	-	-
14	-	+	+	-	+	30	+	+	+	-	+
15	-	+	+	+	-	31	+	+	+	+	-
16	-	+	+	+	+	32	+	+	+	+	+

E: concentración de esporas, I: concentración de indicador, V: volumen del medio de cultivo, Td: tiempo de difusión y Ti: tiempo de incubación.

III.2.1.2. Análisis de las microplacas

Para el estudio de los límites de detección se validaron duplicados de cada una de las treinta y dos unidades experimentales de la Tabla III.6. En cada microplaca, se

ensayaron 16 réplicas de 12 disoluciones de leche fortificadas con penicilina "G" (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 12 µg/l).

Se respetaron los tiempos de difusión (Td: 60' o 90') y tiempo de incubación a $64\pm 1^\circ\text{C}$ (Ti: 3.0 h o 4.0 h) señalados en la Tabla III.6. Los resultados se interpretaron en términos dicotómicos ("positivo" o "negativo") por tres personas calificadas y entrenadas.

III.2.1.3. Análisis estadístico de los resultados

La variabilidad en la respuesta del bioensayo se puede atribuir tanto a "*factores de diseño*" ("FD") como a "*factores de ruido*" ("FR"). Los "FD" son aquellos que pueden ser controlados por el experimentador durante el diseño del bioensayo y durante su elaboración, en cambio los "FR" son aquellos que, afectando a la característica de calidad del método, no pueden ser controlados por diversos factores, entre otros por los costes que ello implica. Los "FR" se deben a las diferentes condiciones operativas por parte del usuario (ejs. prolongación del tiempo de difusión de los antimicrobianos, disminución del tiempo de incubación, etc.).

La dispersión en la respuesta del bioensayo es una consecuencia del ruido externo (existen interacciones entre factores de control y factores de ruido) y del ruido interno (debido a los factores de control y sus interacciones). Es decir, la variabilidad provocada por factores no controlables y la transmitida por los factores de control.

Durante la experimentación, "FC" y algunos de los "FR" se seleccionaron y se fijaron para conocer su efecto sobre la característica de la calidad del método. Los efectos de los factores de ruidos antes seleccionados pueden cuantificarse mediante la experimentación. Para ello, deben elegirse en forma adecuada la matriz de diseño y la matriz de ruido y analizarse minuciosamente los resultados.

Por tratarse de una variable respuesta dicotómica a dos niveles ("positivo" o "negativo"), se empleó el modelo de regresión logística múltiple, por medio de la opción stepwise del procedimiento "LOGISTIC" contenido en el paquete estadístico SAS® (SAS, 2001).

Este método secuencial de selección de variables, permite elegir aquellos factores que afectan en forma significativa ($\chi^2 \geq 3.98$, $p < 0.05$) al modelo, de modo tal que se considere completo cuando todas las variables relevantes participan en el mismo y aquellas no significativas quedan fuera del modelo.

Los diferentes factores contemplados en el diseño fueron estudiados mediante el siguiente modelo mediante el procedimiento LOGISTIC contenido en el paquete estadístico SAS® (SAS; 2001):

$$L_{ijkl} = \text{logit} [P_{ijkl}] = \beta_0 + \beta_i [C]_i + \sum \beta_j [FC]_j + \sum \beta_k [FR]_k + \sum \beta_{jj} [FC]_j * [FC]_j + \sum \beta_{kk} [FR]_k * [FR]_k + \sum \beta_{jk} [FC]_j * [FR]_k + \varepsilon_{ijkl} \quad (\text{Ecuación III.1})$$

Donde: L_{ijkl} = modelo de regresión logística, $[P_{ijkl}]$ = probabilidad relativa de respuesta categórica ("positivo/negativo"), β_0 = intercepto, β_i , β_j , β_k , β_{jj} , β_{kk} , β_{jk} = parámetros estimados por el modelo logístico, $[C]_i$ = concentración de penicilina "G" (i:12), $[FC]_j$ = factores de control en términos codificados (Tabla III.6, j:3), $[FR]_k$ = factores de ruido en término codificado (Tabla III.6, k:2), $[DC]_j * [FC]_j$ = interacciones entre factores de control en términos codificados (jj: 3), $[FR]_k * [FR]_k$ = interacciones entre factores de ruido en términos codificados (kk: 2), $[FC]_j * [FR]_k$ = Interacciones entre los factores de control y de ruido en términos codificados (jk: 6), ε_{ijkl} = error residual del modelo.

Este modelo permite además analizar la variabilidad de los "FR" mediante una selección apropiada de los niveles más convenientes de cada "FC". De este modo, dicho estudio puede llevarse a cabo por medio del análisis de las interacciones $[FC]_j * [FR]_k$. Finalmente, los límites de detección y sus variabilidades se calcularon para los diferentes factores de diseño y ruido que afectaron en forma significativa a la respuesta del bioensayo.

III.2.2. OPTIMIZACIÓN DE BIOENSAYO "BT" PARA LA DETECCIÓN DE TETRACICLINAS EN LECHE

La bacteria-test *G. stearothermophilus* presenta buena sensibilidad para detectar residuos de antibióticos betalactámicos en la leche, no así, para los residuos de tetraciclinas (TCs). Por ello, en este experimento se persiguió como objetivo evaluar diferentes niveles de cloranfenicol (CAP) en el medio de cultivo a fin de mejorar la sensibilidad del método para la detección de residuos de tetraciclinas en la leche, sin afectar su selectividad.

- **Preparación de Bioensayo “BT”:** Se utilizó medio de cultivo PCA (25.5 g/L) enriquecido con 20 g/l de glucosa, inoculado con una suspensión de esporas de *G. stearothermophilus* de modo tal de obtener una concentración final de $2.0 \cdot 10^6$ esporas/ml y púrpura de bromocresol (50 mg/l) en condiciones estériles bajo campana de flujo laminar. El medio de cultivo se dividió en alícuotas con el propósito de evaluar diferentes niveles de cloranfenicol (CAP, Sigma Aldrich Ref. C0378).

- **Selectividad de Bioensayo “BT”:** Se ensayaron los siguientes niveles de “CAP” = 0, 50, 200, 400 y 600 $\mu\text{g/l}$. Se elaboraron cuatro microplacas por cada nivel de “CAP” (20 microplacas) y se procedió al estudio de selectividad según se detalló en el apartado III.1.4.

- **Límites de detección de Bioensayo “BT”:** Se estudiaron las siguientes concentraciones de “CAP” = 0, 50, 200 y 400 $\mu\text{g/l}$. Se prepararon doce microplacas por cada nivel de “CAP” (48 microplacas). Las muestras de leche se fortificaron con disoluciones de tres tetraciclinas detalladas en la Tabla III.3 (clortetraciclina: CTC, oxitetraciclina: OTC y tetraciclina: TC). Las concentraciones de dichas disoluciones se detallan en la Tabla III.7.

Tabla III.7. Concentraciones de tetraciclinas utilizadas para la optimización de Bioensayo “BT”

Tetraciclina	Concentraciones ($\mu\text{g/l}$)
Clortetraciclina	0, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 800
Oxitetraciclina	0, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 300, 400, 500
Tetraciclina	0, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 300, 400, 500

- **Análisis estadístico de los resultados:** Para analizar los efectos de la concentración de cloranfenicol (CAP), tetraciclinas (TCs) y sus interacciones sobre la respuesta del método se empleó la opción stepwise del procedimiento “LOGISTIC” (SAS, 2001). Se postuló el siguiente modelo interactivo que permite evaluar el posible efecto sinérgico entre el “CAP” y TCs.

$$L_{ijkl} = \text{logit} [P_{ijk}] = \beta_0 + \beta_i [TCs]_i + \beta_j [CAP]_j + \beta_{ij} [TCs]_i [CAP]_{ij} + \epsilon_{ijk} \quad (\text{Ecuación III.2})$$

Donde: L_{ijk} = modelo logístico; $[P_{ijk}] = \text{logit} [P_p / (1-P_p)]$: probabilidad de “respuesta positiva”/ probabilidad de “respuesta negativa”; $\beta_0, \beta_i, \beta_j, \beta_{ij}$ = coeficientes estimados por el modelo logístico; $[TCs]_i$ = concentración de tetraciclina ($i=12$ niveles,

Tabla 3), $[CAP]_j$ = concentración de cloranfenicol ($j=4$ niveles: 0, 50, 200 and 400 $\mu\text{g/l}$), $[TCs]*[CAP]_{ij}$ = interacción entre la concentración de tetraciclina y cloranfenicol, ϵ_{ijk} = error residual del modelo.

III.2.3. OPTIMIZACIÓN DE BIOENSAYO “BS” PARA LA DETECCIÓN DE SULFAMIDAS EN LECHE

Debido a la baja sensibilidad que posee *G. stearothermophilus* para detectar residuos de sulfamidas en la leche y a las discrepancias en los niveles de trimetoprim hallados en la bibliografía consultada, se evaluó el efecto de la concentración de “TMP” sobre los límites de detección de las sulfamidas cuando se utiliza Bioensayo “BS”, tratando de aproximar los LDs de las sulfamidas a sus LMRs, sin incrementar los resultados “falsos positivos”, es decir, mantener una selectividad adecuada.

- **Preparación de Bioensayo “BS”:** Se utilizó como medio de cultivo Müeller Hinton (38 g/l) enriquecido con 20 g/l de glucosa, a $\text{pH}=8.2$. La concentración de esporas de *G. stearothermophilus* se ajustó a $0.5 \cdot 10^6$ esporas/ml y la concentración de indicador negro brillante y azul de toluidina se llevaron a 100 mg/l y 5 mg/l, respectivamente. El medio de cultivo se fraccionó en alícuotas con el propósito de analizar diferentes niveles de trimetoprim (TMP, Sigma T-7883).

- **Selectividad de Bioensayo “BS”:** Se utilizaron los siguientes niveles de “TMP” = 0, 20, 40, 60 y 80 $\mu\text{g/l}$. Se elaboraron cuatro microplacas por cada nivel de “TMP” (20 microplacas). Se emplearon muestras de leche libres de residuos de antibióticos precedentes de animales no tratados (IDF-FIL, 2002).

- **Límites de detección de Bioensayo “BS”:** Se prepararon microplacas fortificadas con 0, 20, 40 y 60 $\mu\text{g/l}$ de “TMP”. Se prepararon doce microplacas por cada nivel de “TMP” (48 microplacas). Las muestras de leche se enriquecieron con disoluciones de las cinco sulfamidas detalladas en la Tabla III.3. Las concentraciones de las disoluciones en leche de sulfamidas se muestran en Tabla III.8.

- **Análisis estadístico de los resultados:** Con el propósito de analizar los efectos de la concentración de “TMP”, sulfamidas y sus interacciones con “TMP”, se utilizó la opción stepwise del siguiente modelo de regresión logística:

$$L_{ijk} = \text{logit} [P_{ijk}] = \beta_0 + \beta_i [SAs]_i + \beta_j [TMP]_j + \beta_{ij} [SAs]*[TMP]_{ij} + \epsilon_{ijk} \quad (\text{Ecuación III.3})$$

Donde: L_{ijk} = modelo logístico múltiple; $[P_{ijk}] = \text{logit} [P_p / (1-P_p)]$: probabilidad de resultados “positivos/negativos”; $\beta_0, \beta_i, \beta_j, \beta_{ij}$ = coeficientes estimados por el modelo de regresión logística; $[SAs]_i$ = concentración de sulfamida ($i=12$ niveles, Tabla III.6), $[TMP]_j$ = concentración de TMP ($j=4$ niveles: 0, 20, 40 y 60 $\mu\text{g/l}$), $[SAs]*[TMP]_{ij}$ = interacción entre la concentración de sulfamida en la leche y la concentración de TMP en la microplaca ELISA, ε_{ijk} = error residual. Para las microplacas elaboradas sin TMP, se estimaron únicamente los dos primeros términos (β_0, β_i) de la ecuación anterior.

Tabla III.8. Concentraciones de sulfamidas utilizadas para la optimización de Bioensayo “BS”

TMP	Sulfamidas	Concentración (mg/l)
	Sulfadiazina	0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22
	Sulfadimetoxina	0, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 7, 8
	Sin TMP	
	Sulfametazina	0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22
	Sulfametoxazol	0, 1, 1.25, 1.5, 1.75, 2, 2.25, 2.5, 3, 3.5, 4, 8
	Sulfatiazol	0, 1, 1.25, 1.5, 1.75, 2, 2.25, 2.5, 3, 3.5, 4, 6
Con TMP	Sulfadiazina	0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6
	Sulfadimetoxina	0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.5, 1.8
	Sulfametazina	0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6
	Sulfametoxazol	0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35, 0.4, 0.45, 0.5, 0.6
	Sulfatiazol	0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8, 1

III.2.4. ESTUDIO DE DETECCIÓN DEL SISTEMA MICROBIOLÓGICO EN MICROPLACA 1 (SMmp1)

En este apartado se validó el SMmp1 que consta de Bioensayo “BT” (betalactámicos y tetraciclinas) y Bioensayo “BS” (betalactámicos y sulfamidas) para antibióticos pertenecientes a diferentes familias.

- **Límites de detección de SMmp1:** Se calcularon los límites de detección de 10 antibióticos betalactámicos, 4 aminoglucósidos, 4 macrólidos, 3 tetraciclinas, 5 sulfamidas y 4 quinolonas en leche, según las concentraciones detalladas en la Tabla III.9 (betalactámicos), Tabla III.10 (tetraciclinas y sulfamidas) y Tabla III.11 (Otros agentes antimicrobianos). Para tal fin, se elaboraron 60 Bioensayos “BT” y 60 Bioensayos “BS”. Los tiempos de incubación fueron de 3.0 horas para Bioensayo “BT” y de 4.0 horas para Bioensayo “BS”.

Tabla III.9. Concentraciones de antibióticos betalactámicos utilizados para el cálculo de los límites de detección de SMmp1

Antimicrobiano	Concentraciones ($\mu\text{g/l}$)
<i>Betalactámicos</i>	
Amoxicilina	0, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14
Ampicilina	0, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14
Cloxacilina	0, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70
Oxacilina	0, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 25
Penicilina "G"	0, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 6, 8
Cefadroxilo	0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 250
Cefalexina	0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 250
Cefoperazone	0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 250
Ceftiofur®	0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 250
Cefuroxime	0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 250

Tabla III.10. Concentraciones de tetraciclinas y sulfamidas utilizadas para el cálculo de los límites de detección de SMmp1

Bioensayo	Antimicrobiano	Concentraciones ($\mu\text{g/l}$ o $^*\text{mg/l}$)
	<i>Tetraciclinas</i>	
	Clortetraciclina	0, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35, 0.4, 0.45, 0.5, 0.6, 0.8*
	Oxitetraciclina	0, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 300, 400, 500
	Tetraciclina	0, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 300, 400, 500
Bioensayo "BT"	<i>Sulfamidas</i>	
	Sulfadiazina	0, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 80*
	Sulfadimetoxina	0, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 16, 18, 20*
	Sulfametazina	0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60*
	Sulfametoxazol	0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 15*
	Sulfatiazol	0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 15*
	<i>Tetraciclinas</i>	
	Clortetraciclina	0, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6*
	Oxitetraciclina	0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 1, 1.2, 1.5*
	Tetraciclina	0, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1.2, 1.5*
Bioensayo "BS"	<i>Sulfamidas</i>	
	Sulfadiazina	0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6*
	Sulfadimetoxina	0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.5, 1.8*
	Sulfametazina	0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6*
	Sulfametoxazol	0, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8, 1*
	Sulfatiazol	0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8, 1*

Tabla III.11. Concentraciones de otros agentes antimicrobianos utilizados para el cálculo de los límites de detección de SMmp1

Antimicrobiano	Concentraciones ($\mu\text{g/l}$ o $^*\text{mg/l}$)
<i>Aminoglucósidos</i>	
Estreptomicina	0, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2.0, 2.2, 2.5, 3.0, 4.0*
Gentamicina	0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 1.0, 1.2, 1.5*
Kanamicina	0, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 7.0, 8.0*
Neomicina	0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2.0, 3.0*
<i>Macrólidos</i>	
Eritromicina	0, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 350
Lincosamina	0, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 300
Espiramicina	0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 6*
Tilosina	0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 120, 140, 160
<i>Quinolonas</i>	
Ciprofloxacina	0, 0.6, 0.8, 1, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2.0, 2.2, 2.4, 3.0*
Enrofloxacina	0, 0.6, 0.8, 1, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2.0, 2.2, 2.4, 3.0*
Marbofloxacina	0, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 6.0, 7.0*
Norfloxacina	0, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 8.0, 10*

- **Análisis estadístico de los resultados:** Las curvas dosis-respuesta para cada antibiótico se ajustaron mediante el siguiente modelo de regresión logístico:

$$L_{ij} = \text{logit} [P_{ij}] = \beta_0 + \beta_i [A]_i + \varepsilon_{ij} \quad (\text{Ecuación III.4})$$

Donde: L_{ij} = modelo logístico; $[P_{ij}] = \text{logit} [Pp/(1-Pp)]$: probabilidad de “frecuencia positivos/frecuencias de negativos”); β_0, β_i = coeficientes estimados por el modelo de regresión logística, $[A]_i$ = efecto de la concentración de antibiótico en la leche, ε_{ij} = error residual del modelo.

- **Interpretación de los resultados de SMmp1:** A modo de síntesis, se construyeron tablas simplificadas que facilitan y resumen la información de los límites de detección de ambos bioensayos. Se estableció un cuadro sinóptico que permita interpretar el análisis conjunto de los dos métodos y los inconvenientes de especificidad cruzada.

III.3. DISEÑO, OPTIMIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE SMmp2 (*G. stearothermophilus*, *B. cereus* y *B. subtilis*)

III.3.1. DISEÑO DE BIOENSAYO “B” (*G. stearothermophilus*) PARA LA DETECCIÓN DE BETALACTÁMICOS EN LECHE

A la hora de diseñar un bioensayo que forme parte de un SMmp (betalactámicos, sulfamidas y tetraciclinas) se pretende que cada bioensayo a optimizar presente buena sensibilidad para detectar un grupo de moléculas para el cual resulta específico (por ejemplo betalactámicos) y baja sensibilidad para detectar otros residuos diferentes (por ejemplo sulfamidas y tetraciclinas), a fin de evitar problemas de especificidad cruzada.

En el caso de las sulfamidas, este problema no se manifiesta ya que *G. stearothermophilus* posee muy baja sensibilidad para estos antimicrobianos. Sin embargo, los límites de detección de las tetraciclinas no se alejan demasiado de sus LMRs. Por ello, en este experimento se diseñó un bioensayo específico para betalactámicos. Se optimizaron los niveles de esporas y tiempo de incubación sobre la respuesta del método de modo tal de alejar los límites de detección de las tetraciclinas y evitar sus interferencias.

La hipótesis de trabajo se fundamenta en que, un incremento en el tiempo de incubación del método no ocasiona cambios apreciables en los límites de detección de los betalactámicos (agentes bactericidas), mientras que los niveles de detección de las tetraciclinas (agentes bacteriostáticos) se alejarán cuando se prolonga dicho tiempo.

III.3.1.1. Efecto del tiempo de incubación y concentración de esporas sobre la respuesta de Bioensayo “B” específico para betalactámicos

- **Diseño experimental:** Para evaluar los efectos que producen la concentración de esporas (E) y el tiempo de incubación (Ti) del método sobre la respuesta del Bioensayo “B”, se utilizó un diseño factorial 3 x 4 que permite evaluar tres niveles de “E” en el medio de cultivo y cuatro niveles de “Ti”. Dichos efectos se analizaron para cuatro antibióticos betalactámicos (penicilina “G”, ampicilina, cloxacilina y oxacilina) y tres tetraciclinas (clortetraciclina, tetraciclinas y oxitetraciclina). Para cada antibiótico, nivel de esporas y tiempo de incubación, se prepararon duplicados de microplacas ELISA (84 microplacas en total).

- **Preparación de Bioensayo "B"**: Se utilizó medio de cultivo Müeller Hinton fortificado con 20 g/l de glucosa a pH 8.2±0.1 (Tabla III.2) que se fraccionó en tres alícuotas, a las cuales se agregó una suspensión de esporas de *G. stearothermophilus* C-953 a fin de obtener concentraciones de 2.0 10⁶, 4.0 10⁶ y 8.0 10⁶ esporas/ml. A cada alícuota se adicionó indicador negro brillante y azul de toluidina a niveles de 100 mg/l y 5 mg/l, respectivamente.

- **Límites de detección de Bioensayo "B"**: Las muestras de leche procedentes de animales no tratados (IDF-FIL, 2002) se fortificaron con las cuatro antibióticos betalactámicos y las tres tetraciclinas según los niveles detallados en Tabla III.12. Los bioensayos se retiraron a las 3.0, 3.5, 4.0 y 4.5 horas, según el diseño experimental.

Tabla III.12. Concentraciones de betalactámicos y tetraciclinas utilizadas para la optimización de Bioensayo "B" (*G. stearothermophilus*)

Antimicrobiano	Concentraciones (µg/l o *mg/l)
<i>Betalactámicos</i>	
Ampicilina	0, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20
Cloxacilina	0, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 80
Oxacilina	0, 15, 17.5, 20, 22.5, 25, 27.5, 30, 32.5, 35, 40, 50
Penicilina "G"	0, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6
<i>Tetraciclinas</i>	
Clortetraciclina	0, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 *
Oxitetraciclina	0, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5 *
Tetraciclina	0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2, 2.5 *

- **Análisis estadístico de los resultados**: Los efectos de la transformación logarítmica de la concentración de esporas (Log[E]) y tiempo de incubación (Ti) sobre la respuesta del bioensayo se analizaron mediante el siguiente modelo logístico:

$$L_{ijkl} = \text{logit} [P_{ijkl}] = \beta_0 + \beta_i [A]_i + \beta_j \text{Log}[E]_j + \beta_{jj} (\text{Log}[E]_{jj})^2 + \beta_k [Ti]_k + \beta_{kk} [Ti]_{kk}^2 + \beta_{jk} \text{Log}[E]_j [Ti]_{jk} + \varepsilon_{ijkl} \quad (\text{Ecuación III.5})$$

Donde: L_{ijkl} = modelo logístico; $[P_{ij}]$ = $\text{logit} [Pp/(1-Pp)]$: probabilidad de "frecuencia positivos/frecuencias de negativos"; $\beta_0, \beta_i, \beta_j, \beta_{jj}, \beta_k, \beta_{kk}, \beta_{jk}$ = coeficientes estimados por el modelo logístico; $[A]_i$ = efecto de la concentración de antibiótico ($i=12$ niveles, Tabla III.12) , $\text{Log}[E]_j$ = efecto de la concentración de esporas ($j=3$ niveles: 2.10⁶, 4.10⁶, 8.10⁶ esporas/ml), $(\text{Log}[E]_{jj})^2$ = Efecto cuadrático de la concentración de esporas, $[Ti]_k$ = efecto del tiempo de incubación a cuatro niveles ($k=4$ niveles: 3.0, 3.5,

4.0 y 4.5 horas), $[Ti]_{kk}^2$ = efecto cuadrático del tiempo de incubación, $[E]^*[Ti]_{jk}$ = interacción entre la concentración de esporas y el tiempo de incubación, ε_{ijkl} = residual error del modelo.

- **Análisis de superficie de respuesta:** La metodología de superficie de respuesta (“SR”) es un conjunto de técnicas estadísticas que se emplean para modelar y analizar situaciones problemas. La misma persigue como objetivo la optimización de una respuesta a través de un número mínimo de variables.

Para ello, se efectuó un modelado empírico mediante el empleo de ecuaciones de tipo polinómicos con interacciones, para describir la “SR”. Dicha “SR” se representa como una superficie en un espacio tridimensional que permite visualizar mejor los efectos de las diferentes variables predictivas sobre la respuesta optimizada.

En el área de la química analítica, las técnicas de análisis de “SR” están ampliamente difundidas para el estudio de variables cuantitativas, sin embargo, cuando se dispone de variables respuestas de tipo dicotómicos (como sucede en los métodos de screening), prácticamente no se han encontrado trabajos en la bibliografía consultada.

En el presente estudio se modelaron los límites de detección de los betalactámicos y las tetraciclinas como una función de los niveles de esporas y tiempo de incubación del bioensayo. En esta técnica, al igual que otros procedimientos estadísticos, se trata de lograr el principio de parsinomia, es decir, se busca que la superficie de respuesta quede expresada con un número reducido de variables y polinomios de bajo orden. Se utilizó el criterio propuesto por IDF-FIL (1999, 2002) para el cálculo de los límites de detección y se determinó la SR de los LDs como una función de las variables predictivas (“Log[E]” y “TI”).

- **Optimización mediante la función “deseabilidad”:** En caso de optimizar un sistema que presenta múltiples respuestas, resulta prácticamente imposible optimizar cada una de ellas (maximizar algunas y minimizar otras), como en el presente estudio, donde se desea minimizar los límites de detección de los betalactámicos y maximizar los niveles de detección de las tetraciclinas.

En caso de presentar un reducido número de respuestas, una simple superposición de las gráficas de contorno de la optimización para cada respuesta individual, permite estimar las soluciones. Por el contrario, cuando el número de respuestas es elevado (mayor a 3) la metodología de gráfica no se puede aplicar. Por ello, la función “deseabilidad” provee las condiciones experimentales satisfactorias para obtener la mejor optimización de las respuestas (Design Expert, 2009).

La función “deseabilidad”, postulada por Derringer y Suich (1980), se utiliza ampliamente en la industria para la optimización de procesos con múltiples respuestas (Myers y Montgomery, 1995).

Para el cálculo de dicha función se postula que es posible calcular una función deseable $d_i(Y_i)$ para cada respuesta $Y_i(x)$. Esta función $d_i(Y_i)$ toma valores comprendidos entre 0 y 1, de modo tal que $d_i(Y_i) = 0$ representa un valor no deseable y $d_i(Y_i) = 1$ representa un valor altamente deseable. Las deseabilidades individuales se combinan después, generando la función *Deseabilidad (D)* global:

$$D = (d_1 \times d_2 \times d_i \dots \times d_n)^{\frac{1}{n}} = \left(\prod_{i=1}^n d_i \right)^{\frac{1}{n}} \quad (\text{Ecuación III.6})$$

Donde: n es el número de respuestas, d_i es la deseabilidad específica de la respuesta “ i ” y “ D ” es la deseabilidad global para múltiples respuestas a optimizar. Se debe destacar que en la productoria de la Ecuación III.6, cuando una de las respuestas “ Y_i ” es indeseable, entonces la deseabilidad de esa respuesta $d_i(Y_i)$ será igual a cero, y por lo tanto, la función deseabilidad global será nula. En la práctica se usan los valores de las respuestas estimadas mediante la ecuación de ajuste de la superficie de respuesta en lugar de los valores de las respuestas experimentales.

Además, la función deseabilidad permite asignarle a cada respuesta una importancia relativa con respecto a las demás respuestas. La importancia relativa (r_i) puede tomar valores como “1” para las respuestas menos importante, hasta un valor de “5” para aquellas más importante. En caso de asignar un grado de importancia a cada respuesta, la función deseabilidad se puede expresar de la siguiente forma:

$$D = (d_1^{r_1} \times d_1^{r_2} \times \dots \times d_1^{r_m})^{\frac{1}{\sum r_i}} = \left(\prod_{i=1}^n d_i^{r_i} \right)^{\frac{1}{\sum r_i}} \quad (\text{Ecuación III.7})$$

En caso que todas las respuestas poseen la misma importancia, la función deseabilidad adquiere la forma de la Ecuación III.7. La función deseabilidad permite además maximizar, minimizar o ajustar a un valor fijo ciertas respuestas en forma simultánea, es decir, permite trabajar con diferentes objetivos para cada respuesta.

Para ello, Derringer y Suich (1980) proponen el uso de funciones “ L_i ” (valores bajos), “ U_i ” (valores altos) y “ T_i ” (valores fijos) que pueden elegirse en forma indistinta para cada trabajo de investigación específico. Por ejemplo, en el diseño del bioensayo con elevada especificidad a los residuos de antibióticos betalactámicos y baja sensibilidad a las tetraciclinas, se debe optimizar los valores de “ L_i ” para los primeros y

los valores de “ U_i ” para los segundos. Si se desea maximizar la respuesta de las tetraciclina, la función “deseabilidad” para esta familia de antimicrobianos está definida como:

$$di(\hat{Y}_i(x)) = \begin{cases} 0 & \text{si } \hat{Y}_i(x) < L_i \\ \left(\frac{\hat{Y}_i(x) - L_i}{U_i - L_i} \right)^s & \text{si } L_i \leq \hat{Y}_i(x) \leq U_i \\ 0 & \text{si } \hat{Y}_i(x) > U_i \end{cases} \quad (\text{Ecuación III.8})$$

Para el caso específico de los betalactámicos, que se desea minimizar los límites de detección, la función “deseabilidad” queda definida de la siguiente manera:

$$di(\hat{Y}_i(x)) = \begin{cases} 0 & \text{si } \hat{Y}_i(x) < L_i \\ \left(\frac{U_i - \hat{Y}_i(x)}{U_i - L_i} \right)^s & \text{si } L_i \leq \hat{Y}_i(x) \leq U_i \\ 0 & \text{si } \hat{Y}_i(x) > U_i \end{cases} \quad (\text{Ecuación III.9})$$

La Figura III.1 muestra las curvas de la función deseabilidad cuando se maximiza o minimiza una función para diferentes pesos.

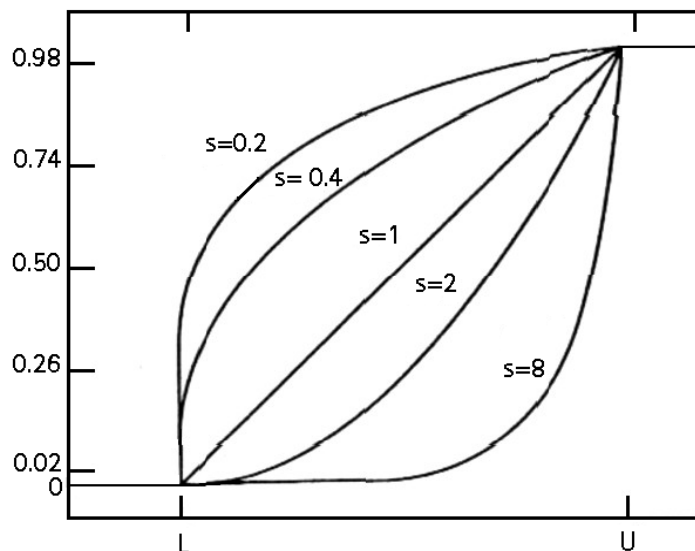


Figura III.1. Efecto de los pesos sobre la función deseabilidad para la maximización o minimización de variables repuestas.

Una vez especificados todos los criterios de optimización, se generarán las coordenadas de las variables independientes donde la función D toma su mayor valor. Se debe aclarar que, en todos los puntos donde la deseabilidad global (D) es distinta de 0, se cumplen todos los criterios especificados, en mayor o en menor medida, por

lo tanto, se puede trabajar experimentalmente en una *zona de condiciones óptimas*, aunque las mejores condiciones podrían ser aquellas donde *D* toma su mayor valor.

III.3.2. DISEÑO DE BIOENSAYO "T" (*B. cereus*) PARA LA DETECCIÓN DE TETRACICLINAS EN LA LECHE

En una primer etapa experimental se persiguió como propósito disminuir el tiempo de respuesta de un bioensayo que utiliza *B. cereus* desde 18-24 horas (Suhren *et al.*, 1996, Nouws *et al.*, 1999_{a,b}) hasta 5 horas mediante un incremento en la concentración de las esporas presentes en el medio de cultivo.

A continuación se aplicó un diseño factorial fraccionado para analizar los efectos de los principales factores que influyen sobre la respuesta de un bioensayo. Finalmente se utilizó un diseño en matriz de Doehlert con análisis de superficie de respuesta y la función deseabilidad para optimizar el método de modo tal de detectar residuos de tetraciclinas a niveles cercanos a sus LMRs.

III.3.2.1. Efecto de la concentración de esporas sobre el límite de detección de tetraciclina en leche y el tiempo de respuesta

- **Preparación de las microplacas:** Se prepararon duplicados de seis microplacas ELISA para analizar seis niveles de esporas de *B. cereus* ($1.6 \cdot 10^3$, $8.0 \cdot 10^3$, $4.0 \cdot 10^4$, $2.0 \cdot 10^5$, $1.0 \cdot 10^6$ y $5.0 \cdot 10^6$ esporas/ml). Se utilizó como medio de cultivo PCA enriquecido con 20 g/l de glucosa sugerido por Surhen y Heeschen (1993). Se adicionó una mezcla de indicadores ácido-base de modo tal de alcanzar concentraciones finales de 45 mg/l de púrpura de bromocresol y 270 mg/l de rojo fenol. Dicho medio se fraccionó en seis alícuotas a las cuales se les agregó un volumen de una suspensión de esporas de *B. cereus* para obtener los niveles antes detallados. Las microplacas se llenaron con un volumen de 100 μ l de medio de cultivo por cada pocillo, se sellaron y se mantuvieron a 4°C hasta su uso.

- **Límites de detección de la tetraciclina:** Para analizar los efectos de la concentración de esporas sobre los límites de detección y tiempo de incubación de bioensayo que utiliza *B. cereus* se ensayaron 16 réplicas de 12 concentraciones de tetraciclina (TC: 0, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 250, 300 μ g/l) utilizando dos microplacas por cada nivel de esporas.

Las microplacas se incubaron en baño de agua flotante a 40°C hasta viraje del indicador del rojo ladrillo a un color amarillo. En el momento que se produjo el viraje de color de las muestras negativas, se determinó el tiempo de incubación para cada nivel de esporas y se interpretaron visualmente los resultados.

- **Análisis estadístico de los resultados:** Se utilizó la opción stepwise del siguiente modelo de regresión logístico de segundo orden:

$$L_{ijk} = \text{logit} [P_{ijk}] = \beta_0 + \beta_i [TC]_i + \beta_j \text{Log}[E]_j + \beta_{jj} (\text{Log}[E]_{jj})^2 + \varepsilon_{ijk} \quad (\text{Ecuación III.10})$$

Donde: L_{ijk} = modelo logístico, $[P_{ij}] = \text{logit} [Pp/(1-Pp)]$: probabilidad de “frecuencia positivos/frecuencias de negativos”), β_0 = ordenada al origen, β_i , β_j , β_{jj} = parámetros estimados por el modelo, $[TC]_i$ = concentración tetraciclina (i:12), $\text{Log}[E]_j$ = transformación logarítmica de la concentración de esporas, $(\text{Log}[E]_{jj})^2$ = cuadrado de la transformación logarítmica de la concentración de esporas, ε_{ijk} = residual error.

Para el estudio del efecto de “Log[E]” presentes en le medio de cultivo sobre el límite de detección (LD) del bioensayo se empleó el siguiente modelo inverso, para lo cual se utilizó el procedimiento “REG” del paquete estadístico SAS® (SAS, 2001).

$$LD_{ij} = \beta_0 - \beta_i / \text{Log} [E]_i + \varepsilon_{ij} \quad (\text{Ecuación III.11})$$

El efecto de “Log[E]” sobre el tiempo de incubación (Ti) se modelizó según la siguiente expresión por medio del procedimiento “REG” contenido en el paquete SAS

$$Ti_{ij} = 10^{(\beta_0 + \beta_i * \text{Log}[E]_i)} + \varepsilon_{ij} \quad (\text{Ecuación III.12})$$

III.3.2.2. Estudio de factores de diseño sobre la respuesta de Bioensayo “T” (*B. cereus*)

- **Diseño experimental:** Con el propósito de evaluar el efecto de los principales factores de diseño sobre la respuesta del bioensayo que utiliza *B. cereus*, se aplicó un diseño experimental fraccionado $2^{(7-4)}$ con replicación que permite analizar los siguientes factores: concentración de glucosa “G”, concentración de indicadores “I”, concentración de esporas “E”, nivel de cloranfenicol en el medio de cultivo “CAP”, volumen de medio de cultivo “V” y temperatura de incubación “TI”.

- **Elaboración de los bioensayos:** Para ello se prepararon duplicados de 8 microplacas ELISA según los niveles de cada factor detallado en la Tabla III.13.

Tabla III.13. Niveles de los factores empleados en el diseño factorial fraccionado para optimización de Bioensayo "T" (*B. cereus*)

Factor	Nivel bajo (-)	Nivel alto (+)
G: Glucosa (g/l)	10	20
I: Concentración de indicadores (mg/l) (RF/PBC)	270/45	330/65
Log E: Log concentración de esporas (esporas/ml)	5.3	6
CAP: Concentración de cloranfenicol (µg/l)	0	400
V: Volumen del medio de cultivo (µl)	100	120
T: Temperatura de incubación (°C)	30	40

RF/PBC: rojo fenol/púrpura de bromocresol.

El medio de cultivo se preparó y esterilizó según se detalló anteriormente. A continuación, se fraccionó en 8 alícuotas para preparar dos microplacas ELISA por cada unidad experimental de Tabla III.14.

Tabla III.14. Matriz del diseño factorial fraccionado 2^{6-3} utilizado para la optimización de Bioensayo "T" (*B. cereus*)

Unidad experimental	Factores					
	Glucosa	Indicador	Log E	CAP	V	T
1	-	-	-	+	+	+
2	+	-	-	-	-	+
3	-	+	-	-	+	-
4	+	+	-	+	-	-
5	-	-	+	+	-	-
6	+	-	+	-	+	-
7	-	+	+	-	-	+
8	+	+	+	+	+	+

- **Límites de detección de tetraciclina:** Posteriormente, para cada unidad experimental del diseño factorial se ensayaron 16 réplicas de las 12 concentraciones de tetraciclina detalladas en el apartado III.3.2.1. Cada bioensayo se selló con bandas adhesivas y se incubó a una temperatura de 30°C o 40°C en un baño de agua flotante,

según el diseño experimental de la Tabla III.14. Las microplacas se retiraron cuando se produjo el viraje de color de las muestras controles negativos (libre de antibióticos).

- **Análisis estadístico de los resultados:** Para seleccionar secuencialmente aquellas variables que afectaron en forma significativa a la curva dosis-respuesta de la tetraciclina en Bioensayo “T”, se utilizó la opción stepwise del siguiente modelo de regresión logística:

$$L_{ijklmnop} = \text{logit} [P_{ijklmnop}] = \beta_0 + \beta_i [TC]_i + \beta_j [G]_j + \beta_k [I]_k + \beta_l \text{Log}[E]_l + \beta_m [CAP]_m + \beta_n [V]_n + \beta_o [T]_o + \varepsilon_{ijklmnop} \quad (\text{Ecuación III.13})$$

Donde: $L_{ijklmnop}$ = modelo logístico, $[P_{ijklmnop}] = \text{logit} [Pp/(1-Pp)]$: probabilidad de “frecuencia positivos/frecuencias de negativos”, β_0 = intercepto, $\beta_i, \beta_j, \beta_k, \beta_l, \beta_m, \beta_n, \beta_o$ = parámetros estimados por el modelo logístico, $[TC]_i$ = concentración de tetraciclina en leche ($i=12$), $[G]_j$ = concentración de glucosa ($j=2$), $[I]_k$ = concentración de indicadores rojo fenol y púrpura de bromocresol ($k=2$), $\text{Log}[E]_l$ = transformación logarítmica de la concentración de esporas ($l=2$), $[CAP]_m$ = concentración de cloranfenicol ($m=2$), $[V]_n$ = volumen del medio de cultivo ($n=2$), $[T]_o$ = temperatura de incubación ($o=2$), $\varepsilon_{ijklmnop}$ = error residual del modelo.

Para aquellos factores que afectaron en forma significativa la respuesta del método, se calcularon los límites de detección de cada bioensayo, aplicando el criterio propuesto por IDF-FIL (2002).

III.3.2.3. Optimización de Bioensayo “T” mediante análisis de superficie de respuesta

- **Diseño según matriz de Doehlert.** Los diseños de Doehlert no presentan la característica clásica de otros diseños de superficie de respuesta, ya que no son ortogonales. Sin embargo, presentan otras ventajas muy importantes con respecto a otros diseños experimentales, ya que requieren de un número reducido de experimentos. Además, muestran una gran flexibilidad comparada con otros diseños clásicos usados en los procesos de optimización, como los diseños central compuesto o Box-Behnken.

Para el caso concreto del presente estudio, que demanda del análisis de superficie de respuesta frente a dos variables (“Log[E]” y “CAP”), el diseño Doehlert

presenta el beneficio de requerir de tan solo siete unidades experimentales (en comparación con las 9 unidades experimentales necesarias en un diseño central compuesto). A partir de estos siete experimentos (sistema con 6 grados de libertad), es posible calcular los dos efectos simples, los dos efectos cuadráticos y la interacción doble entre ambos factores. Por ello, el esquema de Doehlert se puede emplear para generar superficies de respuesta con una buena estimación de los parámetros del modelo y un mínimo número de experimentos en el laboratorio.

Los diseños de Doehlert cubren un amplio campo en la experimentación, en los cuales diversos factores se pueden estudiar a diferentes números de niveles. Estos esquemas se generan a partir de un diseño simplex regular y forman una figura geométrica que contiene (k^2+k+1) unidades experimentales, donde "k" es el número de factores contemplados en el diseño. En el caso concreto de aplicar este diseño a un experimento con dos factores, se requieren de tan solo siete unidades experimentales ($2^2+2+1=7$).

En el diseño Doehlert para dos factores, un triángulo equilátero se gira alrededor del centro de concepción, que es el origen de coordenadas, de modo tal que cada uno de los seis puntos se ubica en la superficie de un círculo de radio unitario (en términos de unidades codificadas). De este modo, las distancias entre los puntos vecinos resultan iguales, por ello se dice que se trata de un diseño centrado y equidistante. En la Figura III.2 se muestran los siete puntos utilizados en el diseño Doehlert para dos factores en unidades codificadas.

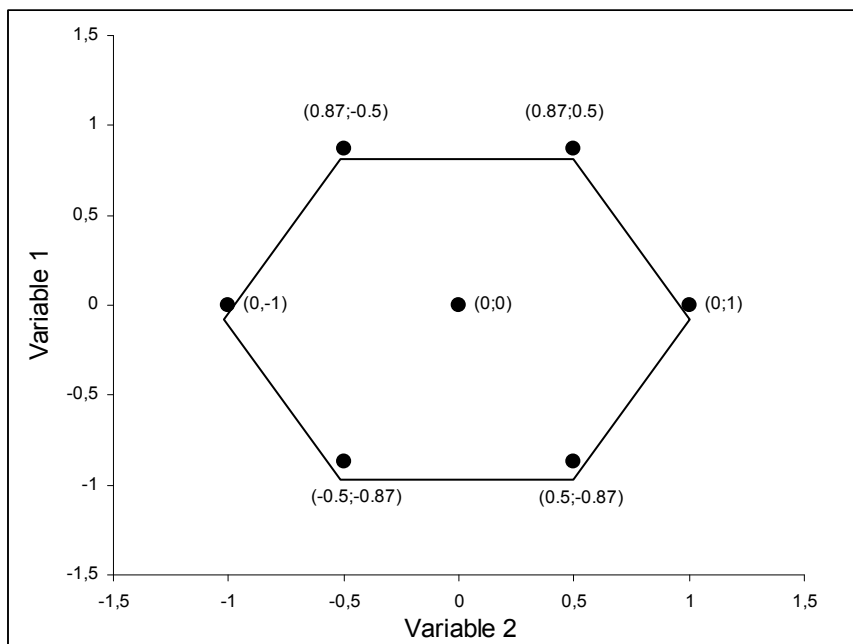


Figura III.2. Esquema del diseño Doehlert para el estudio de dos factores.

- **Preparación de Bioensayo “T” según diseño de Doehlert.** Con el propósito de evaluar los efectos de “Log[E]” y “CAP” se aplicó un diseño Doehlert para los estudios de selectividad y límites de detección de aquellas tetraciclinas (clortetraciclina, oxitetraciclina y tetraciclina) que poseen publicados sus límites máximos de residuos. La concentración de cloranfenicol y esporas (Log [E]) en el medio de cultivo se estudiaron a cinco y tres niveles, respectivamente, según se muestra en la Tabla III.15.

Tabla III.15. Matriz del diseño Doehlert utilizada para la optimización del Bioensayo “T” (*B. cereus*)

Unidad experimental	Niveles codificados		Niveles de las variables	
	Log[E]	[CAP]	Log[E]	[CAP]
1	-0.87	-0.5	5.12	200
2	-0.87	0.5	5.12	600
3	0	-1	5.82	0
4	0	0	5.82	400
5	0	+1	5.82	800
6	0.87	-0.5	6.52	200
7	0.87	0.5	6.52	600

Se utilizó medio de cultivo PCA enriquecido con 20 g/l de glucosa, 45 mg/L de púrpura de bromocresol y 270 mg/l rojo fenol (Tabla III.2). Posteriormente el medio de cultivo se fraccionó en siete alícuotas a las cuales se les adicionó esporas de *B. cereus* y cloranfenicol de modo tal de obtener los niveles detallados en la Tabla III.15. Por cada unidad experimental del diseño Doehlert se elaboraron 10 microplacas (70 bioensayos) para estudiar duplicados de la selectividad (4 microplacas por nivel) y duplicados de los límites de detección de cada tetraciclinas (6 microplacas por nivel).

- **Selectividad de Bioensayo “T”:** Para el estudio de selectividad se emplearon 192 muestras de leche libres de residuos (IDF-FIL, 2002). Cada muestra de leche se analizó por duplicado utilizando dos microplacas ELISA que contenían los niveles de “CAP” y “Log[E]” señalados en Tabla III.15. También se analizaron con el método Copan® test (CH ATK) microplate P&S (Chr Hansen, Hoersholm, Denmark).

- **Límites de detección de Bioensayo “T”:** Para el estudio de los límites de detección, se ensayaron 16 replicas de 12 disoluciones de tetraciclinas en leche, por cada punto del esquema Doehlert. Las concentraciones de tetraciclinas utilizadas se detallan en Tabla III.16.

Tabla III.16. Concentraciones tetraciclinas utilizadas para la optimización del Bioensayo “T” (*B. cereus*) mediante un diseño Doehlert

Tetraciclina	Concentraciones (µg/l)
Clortetraciclina	0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 600, 800
Oxitetraciclina	0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 200, 250, 300
Tetraciclina	0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 200, 250, 300

- **Análisis estadístico de los resultados:** El estudio de los efectos del cloranfenicol (CAP), transformación logarítmica de la concentración de esporas (Log [E]), su interacción y los efectos cuadráticos sobre la curva dosis-respuesta de las tetraciclinas para la optimización de Bioensayo “T” se realizó con la opción stepwise del siguiente modelo logístico:

$$L_{ijkl} = \text{logit} [P_{ijkl}] = \beta_0 + \beta_i [TC]_i + \beta_j \text{Log} [E]_j + \beta_k [CAP]_k + \beta_{jj} (\text{Log} [E]_{jj})^2 + \beta_{kk} [CAP]_{kk}^2 + \beta_{jk} \text{Log}[E]_*[CAP]_{jk} + \varepsilon_{ijkl} \quad (\text{Ecuación III.14})$$

Donde: L_{ijkl} = modelo logístico, $[P_{ijkl}] = \text{logit} [Pp/(1-Pp)]$: probabilidad de “frecuencia positivos/frecuencias de negativos”, β_0 = intercepto, $\beta_i, \beta_j, \beta_k, \beta_{jj}, \beta_{kk}, \beta_{jk}$ = parámetros estimados por el modelo, $[TC]_i$ = efecto de la concentración de TC en la leche ($i:12$), $\text{Log} [E]_j$ = efecto de la transformación logarítmica de la concentración de “E” en el medio de cultivo ($j:3$), $[CAP]_k$ = efecto del nivel de CAP en el medio de cultivo ($k:5$), $(\text{Log}[E]_{jj})^2$ = efecto del cuadrado del logaritmo de “E”, $[CAP]_{kk}^2$ = efecto del cuadrado del nivel de CAP, $\text{Log}[E]_*[CAP]_{jk}$ = efecto de la interacción entre el nivel de $\text{Log}[E]$ y CAP en el medio de cultivo, ε_{ijkl} = error residual del modelo.

Dicho modelo considera que las curvas dosis-respuestas se desplazan paralelas a sí mismas, es decir, no existe interacción entre los niveles de “CAP” con las concentraciones de TCs presentes en las muestras de leche. Esta suposición se puede postular en virtud de los resultados del experimento III.2.2., al no observarse ninguna interacción cuando se utilizó *G. stearothermophilus*.

La estimación de los parámetros del modelo permite estudiar el comportamiento de la superficie de respuesta del bioensayo. Por ello, se construyeron las figuras en 3D que representan los efectos de “Log[E]” y “CAP” sobre los límites de detección de las tres tetraciclinas, a fin de detectar aquellas condiciones de diseño donde sus límites de detección son próximos a sus LMR (100 µg/l).

También se aplicó la función deseabilidad para hallar las mejores condiciones de elaboración de Bioensayo “T” (nivel de esporas y concentración de “CAP”) a fin de ajustar los límites de detección de las tetraciclinas a sus respectivos LMRs.

III.3.3. DISEÑO DEL BIOENSAYO “S” (*B. subtilis*) PARA LA DETECCIÓN DE SULFAMIDAS EN LA LECHE

III.3.3.1. Efecto de la concentración de esporas sobre el límite de detección de sulfatiazol en la leche y el tiempo de respuesta

- **Preparación de las microplacas:** Con la intención de disminuir el tiempo de incubación (18 a 24 horas) del bioensayo en disco (caja de Petri) que utilizan *B. subtilis* propuesto por Nouws *et al.* (1999a,b), se analizó el efecto de los niveles de esporas presentes en el medio de cultivo sobre los tiempos de respuestas y los límites de detección de Bioensayo “S” (*B. subtilis*).

- **Elaboración de los bioensayos:** Como medio de cultivo se utilizó Müller Hinton (38 g/l) enriquecido con 10 g/l de glucosa. Se prepararon duplicados de 6 bioensayos con diferentes concentraciones de esporas de *B. subtilis* ($1.6 \cdot 10^3$, $8.0 \cdot 10^3$, $4.0 \cdot 10^4$, $2.0 \cdot 10^5$, $1.0 \cdot 10^6$ y $5.0 \cdot 10^6$ esporas/ml) y una combinación de indicadores redox constituida por tifeniltetrazolium (150 mg/l) y azul de toluidina (15 mg/l). Este medio se fraccionó en seis alícuotas y a cada una de ellas se adicionó suspensión de *B. subtilis* para alcanzar los niveles mencionados.

- **Límites de detección de sulfatiazol:** Para el estudio de LDs se analizaron 16 réplicas de 12 concentraciones de sulfatiazol (STZ: 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20 mg/l) empleando dos microplacas por cada nivel de esporas. Las microplacas se incubaron en baño de agua a 40°C hasta viraje de la combinación de los indicadores desde el azul original (azul de toluidina) hasta la aparición del color rosado (trifeniltetrazolium). Se registraron los valores de tiempo de incubación y concentración de esporas en el momento del viraje de color de los indicadores.

- **Análisis estadístico de los resultados:** Para analizar los efectos de “Log[E]” y concentración sulfatiazol (STZ) sobre la respuesta del método se empleó la opción stepwise del siguiente modelo logístico:

$$L_{ijkl} = \text{logit} [P_{ijkl}] = \beta_0 + \beta_i [\text{STZ}]_i + \beta_j \text{Log}[E]_j + \beta_k (\text{Log} [E])_k^2 + \varepsilon_{ijkl} \quad (\text{Ecuación III.15})$$

Donde: L_{ijkl} = modelo logístico, $[P_{ij}] = \text{logit} [Pp/(1-Pp)]$: probabilidad de “frecuencia positivos/frecuencias de negativos”), β_0 = ordenada al origen, $\beta_i, \beta_j, \beta_k$ = parámetros estimados por el modelo, $[STZ]_i$ = concentración sulfatiazol (i: 12), $\text{Log}[E]_j$ = transformación logarítmica de la concentración de esporas, $(\text{Log}[E])_{jj}^2$ = cuadrado de la transformación logarítmica de la concentración de esporas, ε_{ijkl} = error residual.

Además, se aplicó el modelo de regresión cuadrático para interpretar el efecto que produce el “Log[E]” en el medio de cultivo sobre el límite de detección (LD) del método, según la siguiente expresión

$$LD_{ij} = \beta_0 + \beta_i [\text{Log } E]_i + \beta_{ii} ([\text{Log } E])_i^2 + \varepsilon_{ij} \quad (\text{Ecuación III.15})$$

En forma similar, se modeló el efecto de “Log[E]” sobre el tiempo de incubación (T_i) del bioensayo, mediante la aplicación del modelo de regresión lineal, según la ecuación recíproca:

$$T_{ij} = \beta_0 + \beta_1 / \text{Log}[E] + \varepsilon_{ij} \quad (\text{Ecuación III.16})$$

III.3.3.2. Estudio de factores de diseño sobre la respuesta de Bioensayo “S” (*B. subtilis*)

- **Diseño experimental:** Mediante la aplicación de un diseño factorial fraccionado $2^{(4-1)}$ con replicación se analizaron los efectos de los factores: Concentración de los indicadores (I) redox (TTZ: Trifeniltetrazolium y AT: azul de toluidina), Concentración de esporas (E), nivel de trimetoprim (TMP) y volumen de medio de cultivo (V) sobre la respuesta del Bioensayo “S” (*B. subtilis*). Se prepararon duplicados de 8 microplacas ELISA según los niveles que se indican en la Tabla III.17.

- **Elaboración de los bioensayos:** Al igual que en el caso anterior, se utilizó Müeller Hinton como medio de cultivo (38 g/l), enriquecido con glucosa (10 g/l), que se fraccionó en 8 alícuotas para preparar dos microplacas ELISA por cada unidad experimental de la Tabla III.18. Se estudiaron 16 réplicas de las 12 concentraciones (2 microplacas) de STZ (STZ: 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 16 mg/l).

Tabla III.17. Niveles de los factores empleados en el diseño factorial fraccionado para optimización de Bioensayo “S” (*B. subtilis*)

Factor	Nivel bajo (-)	Nivel alto (+)
I: Concentración de indicadores (mg/l) (TTZ/AT)	150/15	180/18
Log[E]: Log concentración de esporas (esporas/ml)	6.0	6.70
TMP: Trimetoprim (μg/l)	0	100
V: Volumen del medio de cultivo (μl)	100	120

TTZ/AT: trifeniltetrazolium/Azul de toluidina.

- **Límites de detección de sulfatiazol:** Por cada unidad experimental de la Tabla I.18 se analizaron muestras de leche fortificadas con los niveles de sulfatiazol detallados en el punto anterior.

Tabla III.18. Matriz del diseño factorial fraccionado 2^{4-1} utilizada para la optimización de Bioensayo “S” (*B. subtilis*)

Unidad experimental	Indicador	Log E	TMP	V
1	-	-	-	+
2	+	-	-	-
3	-	+	-	-
4	+	+	-	+
5	-	-	+	+
6	+	-	+	-
7	-	+	+	-
8	+	+	+	+

- **Análisis estadístico de los resultados:** Se utilizó la opción stepwise del procedimiento “LOGISTIC” del paquete estadístico SAS® (SAS, 2001), empleando el siguiente modelo estadístico:

$$L_{ijklmn} = \text{logit} [P_{ijklmn}] = \beta_0 + \beta_i [\text{STZ}]_i + \beta_j [I]_j + \beta_k \text{Log}[E]_k + \beta_l [\text{TMP}]_l + \beta_m [V]_m + \varepsilon_{ijklmn}$$

(Ecuación III.17)

Donde: L_{ijklmn} =modelo logístico, $[P_{ij}] = \text{logit} [P_p/(1-P_p)]$: probabilidad de “frecuencia positivos/frecuencias de negativos”, β_0 =intercepto, β_i , β_j , β_k , β_l , β_m = parámetros estimados por el modelo logístico, $[\text{STZ}]_i$ =concentración de sulfatiazol en

leche ($i:12$), $[I]_j$ =concentración de indicadores ($j=2$), $\text{Log}[E]_k$ =transformación logarítmica de la concentración de esporas ($k=2$), $[\text{TMP}]_l$ =concentración de trimetoprim ($l=2$), $[V]_m$ =volumen del medio de cultivo, ε_{ijk} = error residual del modelo.

III.3.3.3. Efecto de la concentración de trimetoprim sobre los límites de detección de sulfamidas en leche para Bioensayo "S" (*B. subtilis*)

- **Preparación de Bioensayo "S"**: Se empleó el medio de cultivo detallado en el apartado III.3.3.2. con una concentración de esporas de *B. subtilis* igual a $1.0 \cdot 10^6$ esp/ml. El medio de cultivo se fraccionó en diferentes alícuotas para analizar el efecto de los niveles de trimetoprim sobre la selectividad y los límites de detección.

- **Selectividad de Bioensayo "S"**: Se elaboraron microplacas con el agregado de 0, 50, 100, 200 y 300 $\mu\text{g/l}$ de "TMP". Para ello, se prepararon cuatro microplacas ELISA por cada nivel de "TMP" (20 microplacas). Se emplearon 192 muestras de leche libres de antibióticos (IDF-FIL, 2002) que se analizaron por duplicado con Bioensayos "S" (TMP = 0, 50, 100, 200 y 300 $\mu\text{g/l}$) y Copan® test (CH-ATK) microplate P&S (Chr Hansen, Hoersholm, Denmark).

- **Límites de detección de Bioensayo "S"**: Se prepararon diez microplacas ELISA por cada nivel de "TMP" (0, 50, 100 y 200 $\mu\text{g/l}$), 50 microplacas en total. Las muestras de leche se fortificaron con los niveles de sulfamidas que se detallan en la Tabla III.19.

Tabla III.19. Concentraciones de sulfamidas utilizadas en el estudio de los límites de detección de Bioensayo "S"

TMP	Sulfamidas	Concentración (mg/l)
Sin TMP	Sulfadiazina	0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22
	Sulfadimetoxina	0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22
	Sulfametazina	0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22
	Sulfametoxazol	0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22
	Sulfatiazol	0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22
Con TMP	Sulfadiazina	0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8, 1, 1.2
	Sulfadimetoxina	0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8, 1, 1.2
	Sulfametazina	0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.6, 1.8, 2.0, 2.2, 2.5
	Sulfametoxazol	0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8, 1, 1.2
	Sulfatiazol	0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8, 1, 1.2

- **Análisis estadístico de los resultados:** Se evaluó el comportamiento que presenta el “TMP” y la concentración de sulfamidas sobre la respuesta del bioensayo mediante la opción stepwise del siguiente modelo de regresión logística:

$$L_{ijk} = \text{logit} [P_{ijk}] = \beta_0 + \beta_i [SAs]_i + \beta_j [TMP]_j + \beta_{ij} [SAs]*[TMP]_{ij} + \varepsilon_{ijk} \quad (\text{Ecuación III.17})$$

Donde: L_{ijk} = modelo logístico múltiple; $[P_{ijk}] = \text{logit} [P_p / (1-P_p)]$: probabilidad de resultados “positivos/negativos”; $\beta_0, \beta_i, \beta_j, \beta_{ij}$, = coeficientes estimados por el modelo de regresión logística; $[SAs]_i$ = concentración de sulfamida ($i=12$ niveles, Tabla III.19), $[TMP]_j$ = concentración de “TMP” ($j=4$ niveles:), $[SAs]*[TMP]_{ij}$ = interacción entre la concentración de sulfamida en la leche y la concentración de TMP en la microplaca ELISA, ε_{ijk} = error residual. Para las microplacas elaboradas sin TMP, se estimaron únicamente los dos primeros términos (β_0, β_i) de la ecuación anterior.

III.3.4. ESTUDIO DE DETECCIÓN DEL SISTEMA MICROBIOLÓGICO MICROPLACA 2 (SMmp2)

El SMmp2 consta de tres microplacas: Bioensayo “B” (betalactámicos), Bioensayo “T” (tetraciclinas) y Bioensayo “S” (sulfamidas). El uso simultáneo de los tres bioensayos, permitirá identificar antibióticos pertenecientes a estas tres familias. En el presente apartado se evalúan los límites de detección de antibióticos pertenecientes a 6 familias de antimicrobianos.

- **Límites de detección de SMmp2:** se determinaron los LDs de 30 antibióticos (10 betalactámicos, 4 aminoglucósidos, 4 macrólidos, 3 tetraciclinas, 5 sulfamidas y 4 quinolonas). Los antibióticos y sus concentraciones empleadas para Bioensayos “B”, “T” y “S” se muestran en Tabla III.20, Tabla III.21 y Tabla III.22, respectivamente. Las disoluciones en leche se prepararon según se detalló en el apartado III.3. Las temperaturas y tiempos de incubación para cada bioensayo fueron los indicados para cada bacteria-test. Los resultados se interpretaron visualmente en términos dicotómicos “positivo” o “negativo” según la Tabla III.4.

- **Análisis estadístico de los resultados:** Las curvas dosis-respuesta para cada antibiótico se ajustaron con el modelo de regresión logística utilizando el procedimiento “Logistic” (SAS, 2001), mediante el modelo estadístico detallado en el punto III.2.4. Los límites de detección para las interpretaciones visuales se calcularon según se detalló en el apartado III.1.8 (IDF-FIL, 2002).

Tabla III.20. Concentraciones de antibióticos utilizadas para la determinación de los límites de detección de Bioensayo "B" (*G. stearothermophilus*)

Antimicrobiano	Concentraciones ($\mu\text{g/l}$ o mg/l)
<i>Betalactámicos</i>	
Amoxicilina	0, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20
Ampicilina	0, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20
Cloxacilina	0, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 80
Oxacilina	0, 15, 17.5, 20, 22.5, 25, 27.5, 30, 32.5, 35, 40, 50
Penicilina "G"	0, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6
Cefadroxilo	0, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 300
Cefalexina	0, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 300
Cefoperazone	0, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 300
Ceftiofur [®]	0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 350
Cefuroxime	0, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 300
<i>Aminoglucósidos</i>	
Estreptomina	0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 6 *
Gentamicina	0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 1, 1.2, 1.5 *
Kanamicina	0, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 8, 10 *
Neomicina	0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5, 1.75, 2, 2.25, 2.5, 3 *
<i>Macrolidos</i>	
Eritromicina	0, 50, 100, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 800
Lincosamina	0, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 300
Espiramicina	0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 6 *
Tilosina	0, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 120, 140, 160
<i>Tetraciclinas</i>	
Clortetraciclina	0, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 *
Oxitetraciclina	0, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5 *
Tetraciclina	0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2, 2.5 *
<i>Sulfamidas</i>	
Sulfadiazina	0, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 *
Sulfadimetoxina	0, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14 *
Sulfametazina	0, 2.5, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60 *
Sulfametoxazol	0, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 6, 7, 8 *
Sulfatiazol	0, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 6, 7, 8 *
<i>Quinolonas</i>	
Ciprofloxacina	0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5 *
Enrofloxacin	0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 6 *
Marbofloxacina	0, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14 *
Norfloxacina	0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 *

Tabla III.21. Concentraciones de antibióticos utilizadas para la determinación de los límites de detección de Bioensayo "T" (*B. cereus*)

Antimicrobiano	Concentraciones ($\mu\text{g/l}$ o $^*\text{mg/l}$)
<i>Betalactámicos</i>	
Amoxicilina	0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120 *
Ampicilina	0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120 *
Cloxacilina	0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 *
Oxacilina	0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 *
Penicilina "G"	0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120 *
Cefadroxilo	0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 *
Cefalexina	0, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15 *
Cefoperazone	0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 *
Ceftiofur [®]	0, 10, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 *
Cefuroxime	0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 *
<i>Aminoglucósidos</i>	
Estreptomina	0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 *
Gentamicina	0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 *
Kanamicina	0, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14 *
Neomicina	0, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14 *
<i>Macrolidos</i>	
Eritromicina	0, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 300, 400
Lincosamina	0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5, 1.75, 2, 2.25, 2.5, 3 *
Espiramicina	0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 *
Tilosina	0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4*
<i>Tetraciclinas</i>	
Clortetraciclina	0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550
Oxitetraciclina	0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 90, 100, 120, 140
Tetraciclina	0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220
<i>Sulfamidas</i>	
Sulfadiazina	0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120 *
Sulfadimetoxina	0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120 *
Sulfametazina	0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120 *
Sulfametoxazol	0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120 *
Sulfatiazol	0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120 *
<i>Quinolonas</i>	
Ciprofloxacina	0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5 *
Enrofloxacin	0, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5, 1.75, 2, 2.25, 2.5, 3, 3.5 *
Marbofloxacina	0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5 *
Norfloxacina	0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 16 *

Tabla III.22. Concentraciones de antibióticos utilizadas para la determinación de los límites de detección de Bioensayo "S" (*B. subtilis*)

Antimicrobiano	Concentraciones ($\mu\text{g/l}$ o *mg/l)
<i>Betalactámicos</i>	
Amoxicilina	0, 10, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70
Ampicilina	0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60
Cloxacilina	0, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240
Oxacilina	0, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240
Penicilina "G"	0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12
Cefadroxilo	0, 100, 200, 300, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800
Cefalexina	0, 100, 200, 300, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800
Cefoperazone	0, 100, 200, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700
Ceftiofur [®]	0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600
Cefuroxime	0, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000
<i>Aminoglucósidos</i>	
Estreptomina	0, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 6, 7*
Gentamicina	0, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 1000, 1200
Kanamicina	0, 1, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 7*
Neomicina	0, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6*
<i>Macrolidos</i>	
Eritromicina	0, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60
Lincosamina	0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200
Espiramicina	0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600
Tilosina	0, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 120, 140, 160
<i>Tetraciclinas</i>	
Clortetraciclina	0, 50, 100, 200, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800
Oxitetraciclina	0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600
Tetraciclina	0, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700
<i>Sulfamidas</i>	
Sulfadiazina	0, 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 800, 1000, 1200
Sulfadimetoxina	0, 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 800, 1000, 1200
Sulfametazina	0, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800, 2000, 2200
Sulfametoxazol	0, 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 800, 1000, 1200
Sulfatiazol	0, 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 800, 1000, 1200
<i>Quinolonas</i>	
Ciprofloxacina	0, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 300
Enrofloxacin	0, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 300
Marbofloxacina	0, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500
Norfloxacin	0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600

- **Interpretación de los resultados de SMmp2:** Con la intención de facilitar la lectura de los resultados de los límites de detección del SMmp2, se estableció un cuadro que permite una interpretación simple del análisis conjunto de los métodos y los inconvenientes que se presentan debido a la especificidad cruzada de SMmp2.

III.4. ESTRATEGIAS ANALÍTICAS PARA UNA MEJOR DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS EN LA LECHE

Un adecuado sistema de control de residuos de antibióticos en la leche requiere de métodos prácticos, eficaces y simples que permitan detectar la mayor cantidad de sustancias medicamentosas presentes en la leche a niveles próximos a los Límites Máximos de Residuos.

Se puede establecer que, un método de “screening ideal” para la detección de antibióticos debe cumplir dos requisitos. Por un lado, señalar la “*presencia*” o “*ausencia*” de residuos de antibióticos cuando cada molécula se encuentra presente a niveles equivalentes a los LMRs, y por el otro lado, detectar la totalidad de los antimicrobianos que se emplean en la terapéutica del ganado vacuno productor de leche. Además, un adecuado método de cribado, deber ser fácil de utilizar, económico y brindar resultados claros, confiables, repetibles y reproducibles.

En el presente apartado, se han propuesto combinación de bioensayos individuales de los SMmp1 y SMmp2 de modo tal de lograr una mejor “*detección*” e “*identificación*” de residuos de antibióticos en la leche.

Para establecer un sistema simple de combinaciones de métodos que permita una mayor “*detección*” de agentes antimicrobianos, se utilizaron los límites de detección calculados mediante el modelo logístico para los 27 antibióticos que poseen publicados sus LMRs. Se construyeron diagramas de tipo poligonales en escala logarítmica relativa, calculada como el cociente entre el límite de detección de cada antibiótico partido por su correspondiente LMR (LD/LMR).

Con el propósito de seleccionar un sistema microbiológico que permita una mayor “*identificación*” de residuos basado en la combinación de elementos de ambos sistemas (SMmp1 y SMmp2), se construyeron tablas de interpretación conjunta de los resultados, haciendo uso los límites de detección de cada antibiótico calculados en las validaciones anteriores. También se transfirieron en dichas tablas, los inconvenientes asociados a interferencias cruzadas producidas por otras moléculas diferentes a las familias a identificar por cada bioensayo.

Resultados y Discusión

IV. RESULTADOS

IV. 1. RESULTADOS DEL DISEÑO Y OPTIMIZACIÓN DEL SMmp1

IV.1.1. DISEÑO ROBUSTO DE UN BIOENSAYO PARA LA DETECCIÓN DE PENICILINA "G" EN LECHE

En la Tabla IV.1 se muestran los principales parámetros estadísticos calculados mediante la aplicación del modelo de regresión logística. Se puede observar que "V", "E", "Ti" y "Td" afectan en forma significativa ($\chi^2 \geq 3.94$, $p < 0.05$) a la respuesta del bioensayo, mientras que la concentración del indicador "I" no presentó efecto significativo.

Tabla IV.1. Nivel de significación de los efectos principales y sus interacciones dobles sobre la respuesta del bioensayo

Factor	Value χ^2	Value p
V	253.060	0.0001
E	65.0409	0.0001
I	1.4319	0.2315
Td	91.8293	0.0001
Ti	49.1945	0.0001
V*E	87.6928	0.0001
V*I	0.0001	1.0000
V*Td	1.5091	0.2193
V*Ti	21.6658	0.0001
E*I	0.0398	0.8419
E*Td	2.2723	0.1317
E*Ti	16.6472	0.0001
I*Td	0.0398	0.8419
I*Ti	0.1591	0.6900
Td*Ti	0.0090	0.9243

V: Volumen, E: esporas/ml; Ti: Tiempo de Incubación, Td: Tiempo de difusión

También, se aprecia en dicha tabla que influyen en la respuesta del método las interacciones entre "V*E", "V*Ti" y "E*Ti".

La ecuación matemática calculada mediante la opción stepwise del modelo de regresión logística (Ecuación III.1) para aquellos factores que afectan en forma significativa la respuesta del bioensayo es la siguiente:

$$L_{ijkl} = -14.21 + 3.82 [C] - 3.47 [V] - 0.90 [E] + 1.14 [Td] - 0.77 [Ti] - 1.10 [V]*[E] - 0.48 [V]*[Ti] + 0.42 [E]*[Ti] \quad \text{Concordancia} = 99.2 \% \quad \text{(Ecuación IV.1)}$$

El coeficiente de concordancia obtenido mediante este modelo fue elevado (99.2%) poniendo de manifiesto el adecuado grado de ajuste alcanzado mediante el modelo logístico.

Se evidencia que incrementos en "V", "E" y "Ti" producen una disminución en las frecuencias de resultados positivos al bioensayo (valores negativos de los coeficientes " β " del modelo logístico). En efecto, tanto el aumento de "V" como de la concentración de "E" requerirán de mayores concentraciones de penicilina "G" para producir un cambio en la respuesta del bioensayo.

Al respecto, se debe destacar que Müller y Jones (1993) señalan que una mayor concentración de microorganismos en el medio de cultivo produce una pérdida de sensibilidad de un bioensayo, mientras que una disminución de la "E" origina un aumento en la sensibilidad del método, acompañado de menores valores en los LDs.

Por el contrario, en la Ecuación (IV.1) se observa que un aumento en "Td" producirá un incremento en las frecuencias de resultados positivos (valores positivos de los coeficientes " β "), debido a una mayor difusión de los agentes antimicrobianos en los pocillos de las microplaca, acompañado de un aumento en el porcentaje de estos resultados.

Un incremento en el "Ti" permitirá un desarrollo tardío de *G. stearothermophilus* en aquellas pocillos con niveles de penicilina "G" en leche próximos al LD y el viraje del color del indicador se verá ralentizado.

En este sentido, Luitz y Suhren (1995a) destacan una disminución en la sensibilidad del método Delvotest[®] SP cuando se prolonga el tiempo de incubación del método, acompañado de un incremento en el LD, hecho que dependerá del tipo de agente antimicrobiano y de su concentración.

También, el “V” afectó en forma significativa a la respuesta del bioensayo ($\chi^2 = 283.2630$, Tabla IV.1). Este hecho se traduce en un desplazamiento de las curvas logísticas hacia mayores concentraciones de penicilina. En resumen, el incremento de ambos factores produce un desplazamiento de la curva dosis respuesta hacia concentraciones más elevadas de este antibiótico betalactámico.

Los LDs calculados mediante el criterio propuesto por ISO/FDIS (IDF-FIL, 2002) y el modelo de regresión logística para los diferentes niveles de los efectos que afectaron en forma significativa a la respuesta del método se muestran en Tabla IV.2.

Tabla IV.2. Límites de detección de penicilina “G” calculados con el modelo robusto de regresión logística para diferentes factores de control y de ruido

Factores de control		Factores de ruido				Promedio	S.D.
Volumen (μ l)	Esporas (esp/ml)	Td=60' Ti=3.0 h	Td=60' Ti=4.0 h	Td=90' Ti=3.0 h	Td=90' Ti=4.0 h		
100	50000	3.7	4.1	3.2	3.5	3.6	0.38
	200000	3.9	3.8	3.3	3.2	3.6	0.35
120	50000	4.7	5.6	4.1	5.0	4.9	0.62
	200000	6.0	6.4	5.4	5.8	5.9	0.42

Td: Tiempo de Difusión, Ti: Tiempo de Incubación, Límite de detección en μ g/l, S.D.: Desviación estándar

La disposición de los “factores del control” y los “factores de ruido” en esta tabla facilitan su interpretación, puesto que cada línea corresponde a una condición de control que contempla las variaciones que se producen por diversas condiciones operativas (factores de ruido). De esta forma, por ejemplo, cuando se elabora un bioensayo con 100 μ l de medio de cultivo y $0.5 \cdot 10^5$ esporas/ml, el LD del método se halla comprendido entre 3.2 μ g/l (“Td”=90 min, “Ti”=3.0 h) y 4.1 μ g/l (“Td”=60 min, “Ti”=4.0 h). Un bioensayo elaborado con estas características detecta en promedio 3.6 μ g/l de penicilina “G” con una desviación estándar de 0.38 μ g/l, bajo diferentes condiciones operativas, es decir, para diferentes “Td” y “Ti” del usuario.

Este parámetro muestra la variabilidad que se obtiene en el LD para los diferentes niveles de los factores de ruido. Cuando la desviación estándar es pequeña, entonces más robusto será el bioensayo para estos diferentes factores de ruido. En la Tabla IV.2. se observa que las microplacas elaboradas con 100 μ l de medio de cultivo

y 2.0×10^5 esporas/ml (factores de control) presentarán una variabilidad pequeña (SD: $0.35 \mu\text{g/l}$) para diferentes condiciones operativas del laboratorio (“Td” y “Ti”).

Las microplacas que utilizan $120 \mu\text{l}$ de medio de cultivo presentan LDs más elevados al LMR de penicilina “G” ($4 \mu\text{g/l}$), con promedios de $4.9 \mu\text{g/l}$ (para 0.5×10^5 esporas/ml) y $5.9 \mu\text{g/l}$ (para 2.0×10^5 esporas/ml). Este hecho descarta la posibilidad de elaborar un bioensayo con este “V”, puesto que, los límites de detección se alejan con respecto al LMR ($4 \mu\text{g/l}$).

Sin embargo, al trabajar con un $100 \mu\text{l}$ de “V”, se obtienen LDs similares al LMR-UE. Así, por ejemplo, las microplacas diseñadas con 0.5×10^5 esporas/ml, 60 minutos de “Td” y 4.0 horas de “Ti”, presentaron un límite de detección de $4.1 \mu\text{g/l}$.

De todas las condiciones operativas estudiadas, la difusión por un período de 60 minutos seguida de una incubación por un tiempo de 3.0 a 4.0 horas permiten la detección de los residuos de la penicilina “G” en leche a un nivel similar al LMR establecido por UE, CODEX ALIMENTARIUS y CAA, mientras que las otras condiciones de trabajo (“Td” = 90 minutos y “Ti” = 3.0 a 4.0 horas) producen LDs más bajos, acompañados de un aumento en la frecuencia de resultados “falsos no conformes” o “falsos violativos”. Es decir, muestras que contengan una concentración de penicilina “G” inferior a $4 \mu\text{g/l}$, podrían ser clasificadas como “positivas” por el bioensayo y conducir a penalizaciones injustas al productor.

Resumiendo, se puede apreciar que los bioensayos elaborados con un “V” de $120 \mu\text{l}$ presentan un LD comprendido en el rango de 4.1 a $6.4 \mu\text{g/l}$ de penicilina “G”, mientras que los bioensayos preparados con un volumen de $100 \mu\text{l}$ permiten detectar niveles de penicilina “G” en leche dentro del rango 3.2 a $4.1 \mu\text{g/l}$. Se observa también, que la inoculación con 2.0×10^5 esporas/ml presenta LD similares a LMR. Por lo tanto, las condiciones más apropiadas para la elaboración de las microplacas se obtienen cuando se utiliza $100 \mu\text{l}$ de medio de cultivo y 2×10^5 esporas/ml, ya que para dichas condiciones se obtienen límites de detección cercanos al LMR ($4 \mu\text{g/l}$). A su vez, las microplacas elaboradas con las condiciones anteriores, que emplean 60 minutos de “Td” y 3.0 h “Ti” presentaron un LD de $3.9 \mu\text{g/l}$.

Los LDs de penicilina “G” calculados para las diferentes condiciones de trabajo de este bioensayo son similares a los valores obtenidos por otros autores cuando utilizan otros métodos de inhibición microbiológica. Por ejemplo, para el método BRT[®] AiM, Heesch (1993) obtiene un nivel de la detección $5 \mu\text{g/l}$, mientras que Charm y Ruth (1993); Honkanen-Buzalski y Reybroeck (1995); Gardner *et al.* (1996) y Suhren

y Reichmuth (1998) determinan para el método Delvotest® “SP” valores comprendidos en el rango 2.5 - 4 $\mu\text{g/l}$ para residuos de penicilina “G” en leche.

Con el propósito de visualizar las interacciones que resultaron significativas en la Tabla IV.1, se construyeron las Figuras IV.1, Figura IV.2 y Figura IV.3 (para un “Td” = 60 minutos), mediante la aplicación del modelo de regresión logística (Ecuación IV.1).

Para los bioensayos elaborados con bajo volumen de medio de cultivo ($V=100 \mu\text{l}$) y baja concentración de esporas ($E=0.5 \cdot 10^5$ esporas/ml), los cambios en las curvas dosis-respuesta se producen a niveles de penicilina “G” comprendidos entre 2.0 y 6.0 $\mu\text{g/l}$. Un incremento de “E” ($2.0 \cdot 10^5$ esporas/ml) produce un cambio la curva dosis-respuesta a mayores concentraciones de penicilina “G” (entre 2.0 y 7.0 $\mu\text{g/l}$).

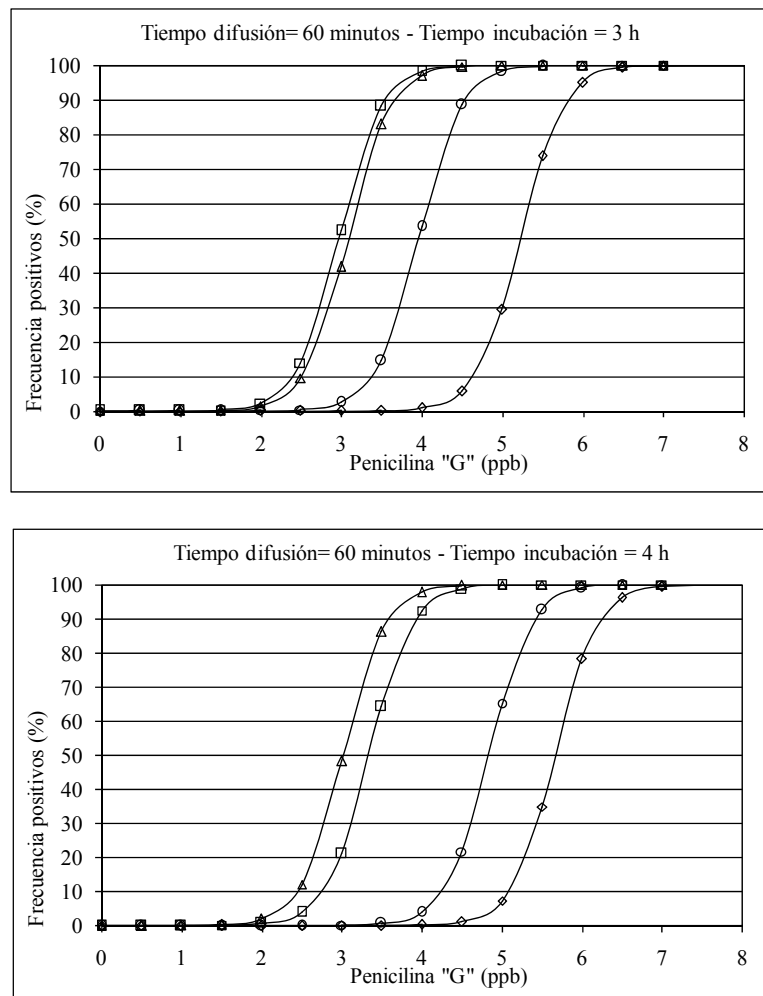


Figura IV.1. Efectos del volumen del medio de cultivo y la concentración de esporas sobre las curvas dosis-respuesta de la penicilina “G” en leche (\square $V: 100 \mu\text{l}$ - $E: 0.5 \cdot 10^5$ esporas/ml; \circ $V: 120 \mu\text{l}$ - $E: 0.5 \cdot 10^5$ esporas/ml; Δ $V: 100 \mu\text{l}$ - $E: 2.0 \cdot 10^5$ esporas/ml; \diamond $V: 120 \mu\text{l}$ - $E: 2.0 \cdot 10^5$ esporas/ml).

La Figura IV.1 muestra los efectos que “V” y “E” producen sobre las curvas dosis-respuesta de la penicilina “G” para los dos niveles de Ti. Se evidencia que las curvas logísticas se encuentran más próximas cuando el bioensayo se elabora con bajo “V” (100 μ l), en comparación con los bioensayos preparados con alto “V” (120 μ l).

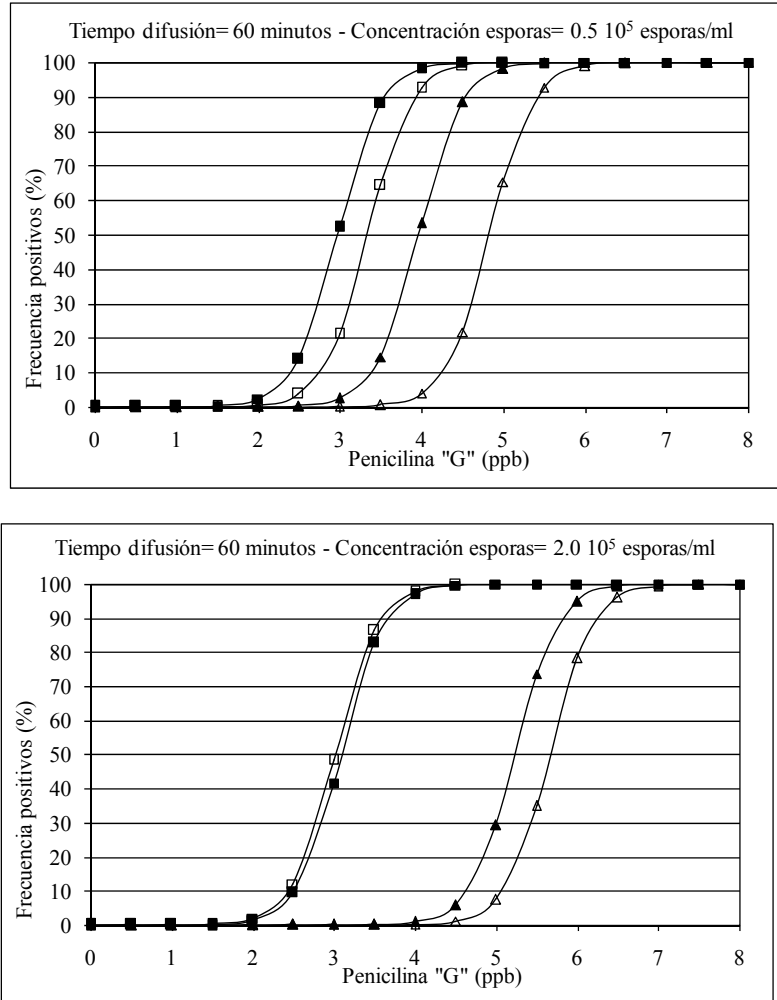


Figura IV.2. Efectos del volumen de medio de cultivo y el tiempo de incubación sobre las curvas dosis-respuesta de la penicilina “G” en leche (■ V: 100 μ l- Ti: 3.0 h; □ V: 100 μ l - Ti: 4.0 h; ▲ V: 120 μ l- Ti: 3.0 h; Δ V: 120 μ l - Ti: 4.0 h).

En forma similar, la Figura IV.2 presenta los efectos que producen “V” y “Ti” sobre la curva dosis-respuesta de la penicilina “G” en leche para los dos niveles de “E” ensayados. Puede observarse que para diferentes valores de “Ti”, las curvas logísticas se encuentran próximas cuando “V” es bajo (100 μ l), en comparación con los bioensayos preparados con alto nivel de “V” (120 μ l). Esta interacción que se visualiza en Figura IV.2 muestra la ventaja de elaborar los bioensayos con 100 μ l de medio de cultivo, puesto que los resultados del método son más estables (condiciones más robustas del bioensayo), frente a diferentes “Ti”.

De la misma manera, la Figura IV.3 muestra los efectos de “E” y “Ti” sobre las curvas dosis-respuesta de la penicilina “G” para los dos niveles de “V”. La interacción entre ambas variables se pone de manifiesto al analizar las proximidades de las curvas dosis-respuesta. En efecto, las curvas logísticas son más cercanas cuando el bioensayo se elabora con alta “E” ($2.0 \cdot 10^5$ esporas/ml) en comparación con las microplacas obtenidas con baja “E” ($0.5 \cdot 10^5$ esporas/ml). Por esta razón, un bioensayo elaborado con más “E” presentará mayor robustez frente a los diferentes “Ti” (3.0 o 4.0 horas).

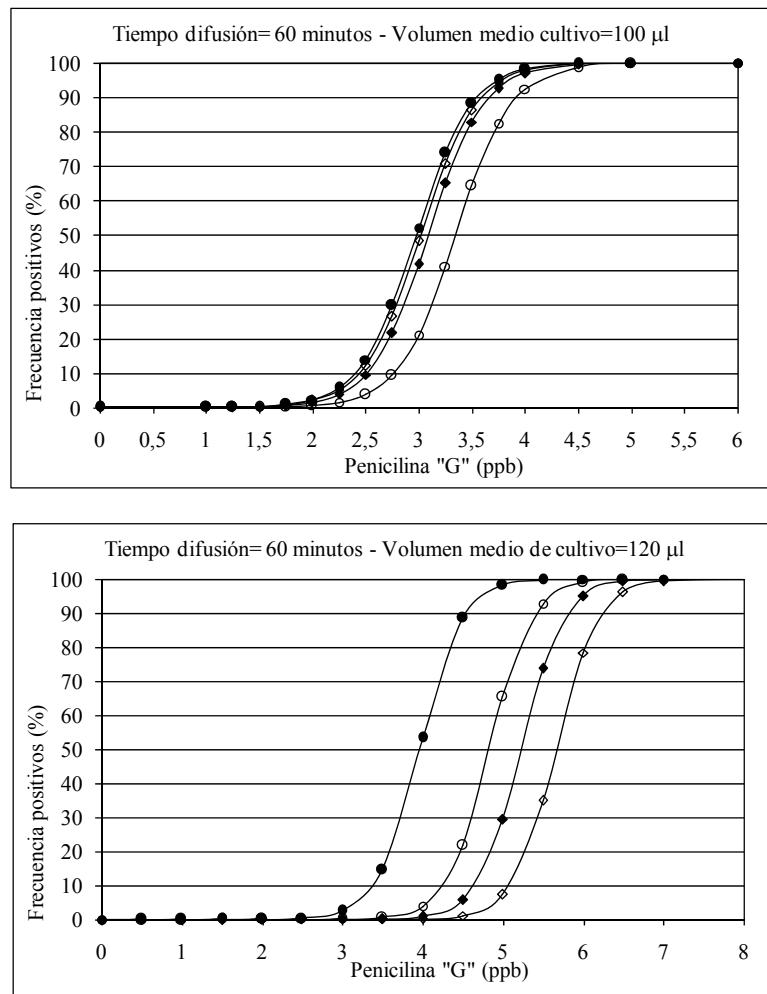


Figura IV.3. Efectos de la concentración de esporas y del tiempo de incubación sobre las curvas dosis-respuestas de la penicilina “G” en leche (• E: $0.5 \cdot 10^5$ esporas/ml - Ti: 3.0 h; ○ E: $0.5 \cdot 10^5$ esporas/ml - Ti: 4.0 h; ◆ E: $2.0 \cdot 10^5$ esporas/ml - Ti: 3.0 h; ◇ E: $2.0 \cdot 10^5$ esporas/ml - Ti: 4.0 h).

Por último, debe mencionarse que, el “Td” como factor de ruido no puede controlarse mediante los factores de control contemplados en el diseño experimental, en el momento de elaborar los bioensayos, puesto que no resultaron significativas las interacciones entre los factores del control y el “Td” (Ecuación IV.1).

A modo de síntesis, se puede establecer que las técnicas del diseño experimental pueden emplearse satisfactoriamente para la optimización de un bioensayo que presente respuesta dicotómica. Además, se puede concluir que las variables volumen del medio “V”, concentración de esporas “E”, tiempo de difusión “Td” y tiempo de incubación “Ti” afectaron la respuesta del bioensayo mientras que la concentración del indicador no presentó un efecto significativo. Cuando los microplacas se elaboran con 100 µl de medio de cultivo, $2.0 \cdot 10^5$ esporas/ml, se emplea un “Td” de 60 minutos a 4°C y un “Ti” comprendido entre 3.0 y 4.0 horas a 64°C, el método puede detectar 3.9-3.8 µg/l de la penicilina “G”, valores muy cercanos al LMR (4 µg/l). Mediante este diseño robusto, el tiempo de incubación del bioensayo puede controlarse cuando se utiliza 100 µl de medio de cultivo y una concentración de esporas equivalente a $2.0 \cdot 10^5$ esporas/ml.

IV.1.2. RESULTADOS DE LA OPTIMIZACIÓN DEL BIOENSAYO “BT” PARA LA DETECCIÓN DE TETRACICLINAS EN LECHE

Debido a la baja sensibilidad de *G. stearothermophilus* para la detección de tetraciclinas en leche, se evaluó la incorporación de “CAP” (cloranfenicol) en el medio de cultivo. Se debe considerar que, las mejoras en los límites de detección de las tetraciclinas debido a la incorporación de este antimicrobiano puede perjudicar a la selectividad del bioensayo, al incrementar la frecuencia de resultados falsos positivos.

Por este motivo, se evaluaron en forma conjunta los dos parámetros del método, la selectividad y el límite de detección, de modo tal de optimizar la detección de residuos de tetraciclinas a niveles cercanos a sus LMRs, sin incrementar los resultados “falsos positivos”.

IV.1.2.1. Selectividad de Bioensayo “BT” para detección de tetraciclinas en leche

Los resultados obtenidos después de analizar 192 muestras de leche libres de antibióticos mediante bioensayos elaborados con diferentes niveles de “CAP”, se muestran en la Tabla IV.3. Se observa que, la adición de “CAP” en el medio de cultivo no produce un aumento en la frecuencia de los resultados positivos (97.9%) hasta una concentración de 400 µg/l, obteniendo la misma selectividad que al emplear el método microbiológico Copan CH-ATK®.

Tabla IV.3. Efectos de los niveles de CAP sobre la selectividad del bioensayo

Bioensayo	Número Muestras	Positivo	Negativo	Selectividad (%)
Bioensayo 0 µg/l CAP	192	4	188	97.9
Bioensayo 50 µg/l CAP	192	4	188	97.9
Bioensayo 200 µg/l CAP	192	4	188	97.9
Bioensayo 400 µg/l CAP	192	4	188	97.9
Bioensayo 600 µg/l CAP	192	23	169	88.0
Copan CH-ATK [®] Test	192	4	188	97.9

Selectividad: "resultados negativos/número de muestras".

Por el contrario, la incorporación de 600 µg/l del "CAP" produce un aumento en la frecuencia de resultados positivos del bioensayo, si se compara con las microplacas preparadas con menores niveles (23 vs. 4), acompañado por una notable disminución en su selectividad (88.0%). Por esta razón, el estudio de límites de detección de las tetraciclinas en leche se realizó con bioensayos fortificados con diferentes niveles de "CAP", hasta alcanzar a los 400 µg/l.

Debe destacarse que la selectividad (97.9%) de los microplacas fortificadas con 400 µg/l de CAP resultó similar a los valores de 98% (Sischo y Burns, 1993) y 95% (Charm y Zomer, 1995) determinados con el método Delvotest[®] y al 99% señalado por Roca *et al.* (2007) para los métodos Delvotest[®] SP-NT, Eclipse[®] 100 y Eclipse[®] 50, todo ello en muestras de leche de vaca.

IV.1.2.2. Límites de detección de tetraciclinas en leche analizadas con Bioensayo "BT"

Tabla IV.4 resume los resultados obtenidos mediante el procedimiento stepwise del modelo de regresión logístico con interacción (Ecuación III. 2). Se observa que los niveles de "CAP" presentes en el medio de cultivo afectaron en forma significativa ($p < 0.0001$) a la respuesta del bioensayo para las tres TCs analizadas.

Por el contrario, la interacción de la concentración de las TCs y los niveles de "CAP" en el medio de cultivo no resultó significativa ($p > 0.05$) en ningún caso. Este hecho demuestra que el "CAP" produce un efecto antimicrobiano en el bioensayo, sin llegar a manifestar una acción sinérgica con las TCs.

Tabla IV.4. Valores de χ^2 y probabilidad para los diferentes factores que afectan la respuesta de los bioensayos elaborados con CAP para la detección de tetraciclinas

Tetraciclinas	[TCs]		[CAP]		[TCs]*[CAP]	
	Valor " χ^2 "	Valor "p"	Valor " χ^2 "	Valor "p"	Valor " χ^2 "	Valor "p"
Clortetraciclina	148.3518	0.0001	97.3408	0.0428	0.0531	0.8177
Oxitetraciclina	149.6728	0.0001	75.8476	0.0001	0.2845	0.5937
Tetraciclina	113.0115	0.0001	100.0742	0.0001	0.0637	0.8008

TCs: Tetraciclinas, CAP: Cloranfenicol.

Si bien ambos antimicrobianos presentan similar mecanismo de acción, al impedir la síntesis de proteínas a nivel de los ribosomas de las bacterias, no se manifestó una acción sinérgica por parte de ambos.

De hecho, el modelo logístico señala una simple adición de los efectos antimicrobianos del "CAP" y las TCs, en comparación con otros agentes antimicrobianos que presentan un efecto sinérgico, como por ejemplo "sulfamidas – antifolatos" (trimetoprim, tetroxoprim, pirimetamina) o "penicilinas – ácido clavulánico".

Los coeficientes obtenidos para las tres tetraciclinas por medio del modelo de regresión logístico se presentan en la Tabla IV.5. Los valores de los coeficientes " β_1 " señalan un aumento en la frecuencia de resultados positivos en la medida que aumenta la concentración de TCs en la leche. El mayor valor del coeficiente " β_1 " (caso de TC) indica que pequeños incrementos en su concentración producirá grandes aumentos en la frecuencia de resultados positivos, mientras que bajos valores de β_1 (caso de la CTC y OTC) indican que se requieren mayores aumentos en sus concentraciones para alcanzar el 100% de resultados positivos.

De forma similar, los coeficientes " β_2 " muestran la magnitud de la acción antimicrobiana causada por el "CAP" presente en el medio. Debido a la similitud en los valores de estos coeficientes para las tres TCs, al estar comprendidos entre $\beta_2=0.0108$ (OTC) y $\beta_2=0.0158$ (TC), se pone de manifiesto una acción antimicrobiana semejante por parte del "CAP". Este hecho puede atribuirse a que "CAP" interviene a nivel de Ribosoma "50S" mientras que las TCs lo hacen en el Ribosoma "30S", actuando en forma independiente uno de otro e indistinto para las diferentes moléculas de TCs.

En dicha tabla, se observa que los coeficientes de concordancia fueron altos, situándose entre 98.2% (CTC) y 99.0% (TC), hecho que demuestra un buen ajuste logrado por el modelo logístico.

Tabla IV.5. Ecuaciones logísticas de las curvas dosis-respuestas de las tetraciclinas para los bioensayos preparados con diferentes niveles de “CAP”

TCs	Logit [P] = $\beta_0 + \beta_1$ [TCs] + β_2 [CAP]	C
Clortetraciclina	Logit [P] = -9.8056 + 0.0216 [CTC] + 0.0148 [CAP]	98.2
Oxitetraciclina	Logit [P] = -8.1687 + 0.0249 [OTC] + 0.0108 [CAP]	98.6
Tetraciclina	Logit [P] = -10.2874 + 0.0438 [TC] + 0.0158 [CAP]	99.0

CTC: Clortetraciclina, OTC: Oxitetraciclina, TC: Tetraciclina, CAP: Cloranfenicol, C: Coeficiente de concordancia porcentual.

La Figura IV.4 muestra el efecto de las concentraciones de TCs y “CAP” sobre la frecuencia relativa de resultados positivos, así como las curvas construidas por medio del modelo de regresión logístico (coeficientes “ β_0 ”, “ β_1 ” y “ β_2 ”, la Tabla IV.5). Un aumento en la concentración del “CAP” produce un desplazamiento de la curva dosis-respuesta hacia concentraciones más bajas, mejorando la sensibilidad del bioensayo. Además se observa que niveles de “CAP” equivalente a 400 $\mu\text{g/l}$ no producen un incremento en el intercepto de las curvas dosis-respuesta, es decir, no aumentan la frecuencia de resultados “falsos-positivos” al bioensayo.

En la Tabla IV.6, se resumen los límites de detección de los bioensayos elaborados con diferentes niveles de “CAP” calculados por medio del modelo logístico y el criterio propuesto por IDF-FIL (2002), junto con los valores de los LMRs. La incorporación de “CAP” al medio de cultivo produce una disminución en los LDs de las TCs, aunque esta mejora no logra alcanzar los valores de LMRs.

Cuando se consideran otros test de inhibición microbiológica que utilizan *G. stearothermophilus*, se observa que Delvotest “SP” presenta límites de detección para OTC de 400 $\mu\text{g/l}$ (Zaadhof *et al.*, 1997) o de 500 $\mu\text{g/l}$ (Luitz y Suhren, 1996) y de 600 $\mu\text{g/l}$ (Senyk *et al.*, 1990) para TC en leche, que resultan superiores a los obtenidos en este trabajo.

El método BRT[®] AiM muestra altos valores en sus límites de detección. Así, Frank (1995) obtiene valores cercanos a 5000 $\mu\text{g/l}$ cuando analiza residuos de OTC y de TC en leche de la vaca. Se debe destacar que, estos LDs son elevados para el método BRT[®] AiM, puesto que este bioensayo utiliza Müller Hinton y un indicador redox (Negro Brillante) sin la adición de sustancias secuestrantes de calcio.

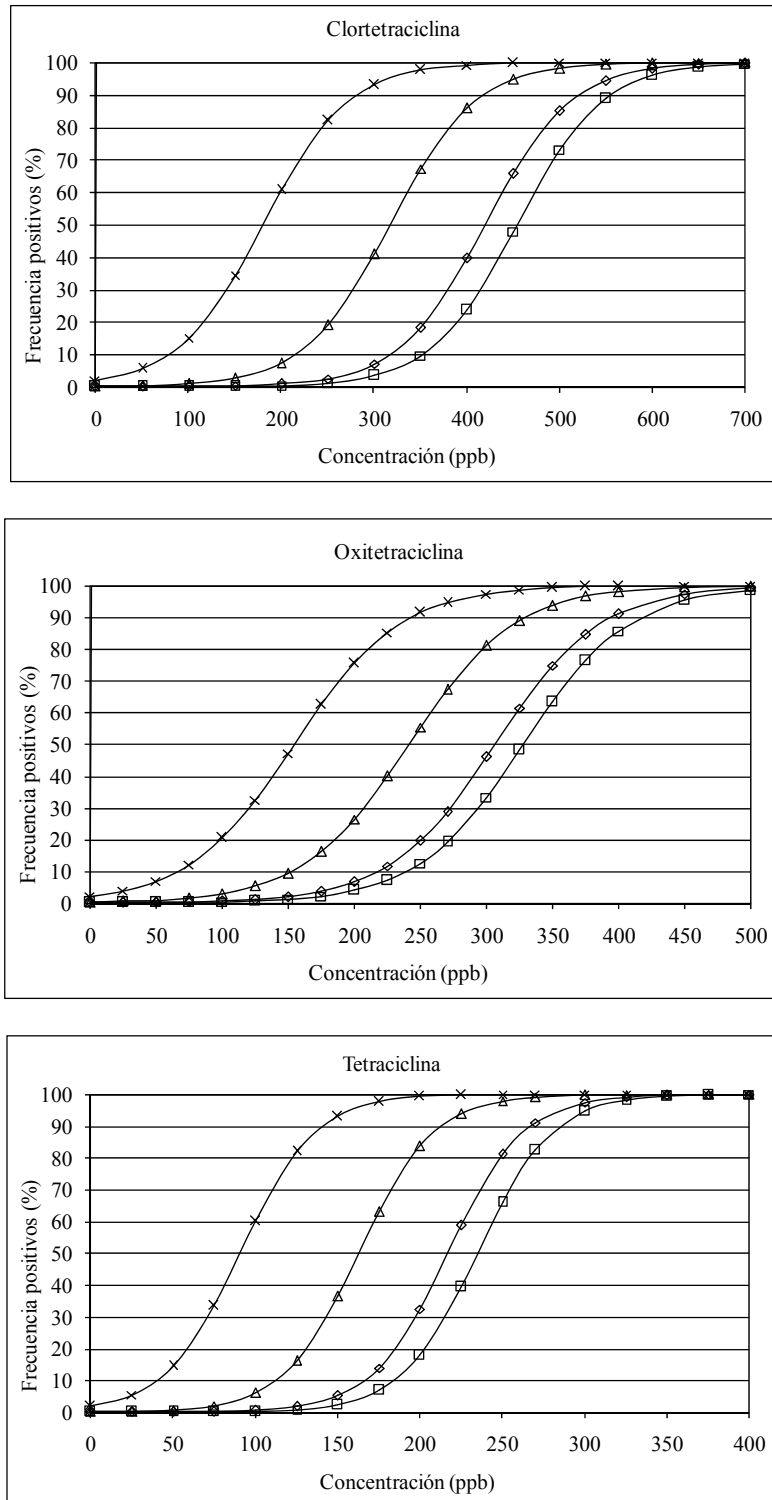


Figura IV.4. Curvas dosis-respuesta de las tetraciclinas para diferentes concentraciones de cloranfenicol en el medio de cultivo (\square CAP: 0 $\mu\text{g/l}$, \diamond CAP: 50 $\mu\text{g/l}$, Δ CAP: 200 $\mu\text{g/l}$, X CAP: 400 $\mu\text{g/l}$).

Tabla IV.6. Efecto de la concentración de CAP en el bioensayo sobre los límites de detección ($\mu\text{g/l}$) de tetraciclinas en leche

Tetraciclinas	Concentración "CAP" ($\mu\text{g/l}$)				LMR*
	0	50	200	400	
Clortetraciclina	590	556	453	275	100
Oxitetraciclina	446	425	360	150	100
Tetraciclina	302	284	230	158	100

* LMR ($\mu\text{g/l}$), Limite Máximo de residuo establecidos por EU, "CAP": Cloranfenicol.

En forma similar, el método Eclipse® "100ov" puede detectar 500 $\mu\text{g/l}$ de CTC y 460 $\mu\text{g/l}$ de TC en leche de oveja (Montero *et al.*, 2005), valores superiores a los alcanzados en este trabajo para un bioensayo suplementado con "CAP" en el medio.

En leche de otras especies, el método Delvotest® SP que contiene agentes quelantes en el medio de cultivo posee LDs más elevados a los calculados en este trabajo para 400 $\mu\text{g/l}$ de "CAP" (Tabla IV.6), ya que detecta 320 $\mu\text{g/l}$ de OTC y 590 $\mu\text{g/l}$ de TC (Althaus *et al.*, 2002).

Debe mencionarse que las TCs poseen una tendencia a formar complejos quelantes con iones bivalentes (Rogalsky, 1985). Sin embargo, estos antimicrobianos pueden ser desplazados de estos complejos mediante la adición de agentes secuestrantes de calcio mas fuertes, como por ejemplo EGTA (Adriany, 1995). A modo de síntesis se puede establecer que la incorporación de "CAP" mejora los LDs de las TCs, pero no llegan a ser iguales a sus LMRs. Por ello, deberían llevar a cabo estudios para mejorar la sensibilidad del *G. stearothermophilus* hacia las TCs, mediante la incorporación simultánea de "CAP" y agentes quelantes de calcio, puesto que no existen antecedentes de este tipo en la bibliografía consultada.

IV.1.3. RESULTADOS DE LA OPTIMIZACIÓN DE BIOENSAYO "BS" PARA LA DETECCIÓN DE SULFAMIDAS EN LECHE

La optimización de un bioensayo persigue un doble objetivo, por un lado la detección de un analito cuando el mismo se halla presente en la muestra de leche a un nivel equivalente a su LMR (elevada sensibilidad - adecuados LDs), y por el otro lado, no acusar resultados positivos cuando las muestras de leche están libres de antimicrobianos (buena selectividad). Por ello, en este estudio se ha planificado la

optimización del bioensayo para la detección de residuos de sulfamidas en leche, considerando los dos parámetros que caracterizan a un método: selectividad y límites de detección.

IV.1.3.1. Selectividad del Bioensayo “BS” para la detección de sulfamidas en leche

Los resultados obtenidos cuando se analizaron duplicados de 192 muestras de leche mediante los bioensayos elaboradas con diferentes niveles de “TMP” (trimetoprima) y el método Copan[®] CH-ATK Test se muestran en la Tabla IV.7.

Tabla IV.7. Efecto de la concentración de “TMP” en el medio de cultivo sobre la selectividad de los bioensayos

TMP (µg/l)	Número Muestras	Positivo	Negativo	Selectividad (%)
0	192	7	185	96.3
20	192	8	184	95.8
40	192	8	184	95.8
60	192	8	184	95.8
80	192	22	170	88.5
Copan CH-ATK [®] Test	192	8	184	95.8

“TMP”: trimetoprim, Selectividad=“resultados positivos/número de muestras”.

Se observa que la selectividad de los bioensayos fortificados con 20, 40 y 60 µg “TMP”/l resultó igual a la obtenida al emplear el método Copan[®] CH-ATK Test (95.8%). Por el contrario, los menores valores de selectividad se lograron cuando el bioensayo se fortifica con 80 µg TMP/l (88.5%).

La concentración de 60 µg “TMP”/l fue sugerida por Langeveld *et al.* (2005), aunque Adriany *et al.* (1995) emplea un nivel levemente inferior (50 µg “TMP”/l). Por el contrario Nouws *et al.* (1995) recomienda una concentración muy elevada (150 µg TMP/l) para mejorar la sensibilidad del método que utiliza *G. stearothermophilus* hacia las sulfamidas en leche.

Al respecto, se debe considerar que un buen método debe poseer adecuada sensibilidad para detectar el antimicrobiano presente en la muestra de leche sin disminuir su selectividad. Por ello, el empleo de 80 µg “TMP”/l resulta perjudicial, ya que incrementa la frecuencia de resultados “falsos positivos” al método.

IV.1.3.2. Límites de detección de sulfamidas en leche analizadas con Bioensayo "BS"

IV.1.3.2.1. Curvas dosis-respuesta de sulfamidas en leche para Bioensayo "BS" elaborado sin TMP

El modelo de regresión logística señaló efectos significativos para las concentraciones de las cinco sulfamidas en leche. En la Tabla IV.8. se muestran las ecuaciones matemáticas calculadas mediante la aplicación del modelo de regresión logística y los coeficientes de concordancia. Los ajustes logrados mediante este modelo fueron buenos, ya que las concordancias están comprendidas entre 90.5% para la SMZ y 96.9% para SMX.

Tabla IV.8. Ecuaciones logísticas de las curvas dosis-respuestas de sulfamidas para el bioensayo sin TMP en el medio de cultivo

Sulfamidas	Logit [P] = $\beta_0 + \beta_1$ [SAs]	C
Sulfadiazina	Logit [P] = -7.513 + 0.0006 [SDZ]	94.7
Sulfadimetoxina	Logit [P] = -13.215 + 0.0024 [SDM]	95.1
Sulfametazina	Logit [P] = -7.745 + 0.0004 [SMZ]	90.5
Sulfametoxazol	Logit [P] = -11.964 + 0.0037 [SMX]	96.9
Sulfatiazol	Logit [P] = -10.243 + 0.0031 [STZ]	96.7

SDZ: sulfadiazina, SDM: sulfadimetoxina, SMZ: sulfametazina, SMX: sulfametoxazol, STZ: sulfatiazol, C: Coeficiente de concordancia porcentual.

En Figura IV.5 se observa el efecto de las concentraciones de las SAs sobre la frecuencia de resultados positivos para los bioensayos elaborados sin "TMP". Se aprecia un comportamiento similar en las curvas dosis-respuesta para SDM, SMX y STZ (por presentar similares valores en sus coeficientes " β_1 ", Tabla IV.8), mientras que las curvas dosis-respuesta correspondientes a SDZ y SMZ muestran una inhibición menor cuando se incrementan las concentraciones de SAs (menores valores de los coeficientes " β_1 ", Tabla IV.8.).

De todas las SAs analizadas, SDM, SMX y STZ presentaron menores LDs (mayores valores de los coeficientes " β_1 "), debido a cierta sensibilidad del microorganismo de prueba para estos antimicrobianos, en comparación con el resto de SAs evaluadas en este trabajo.

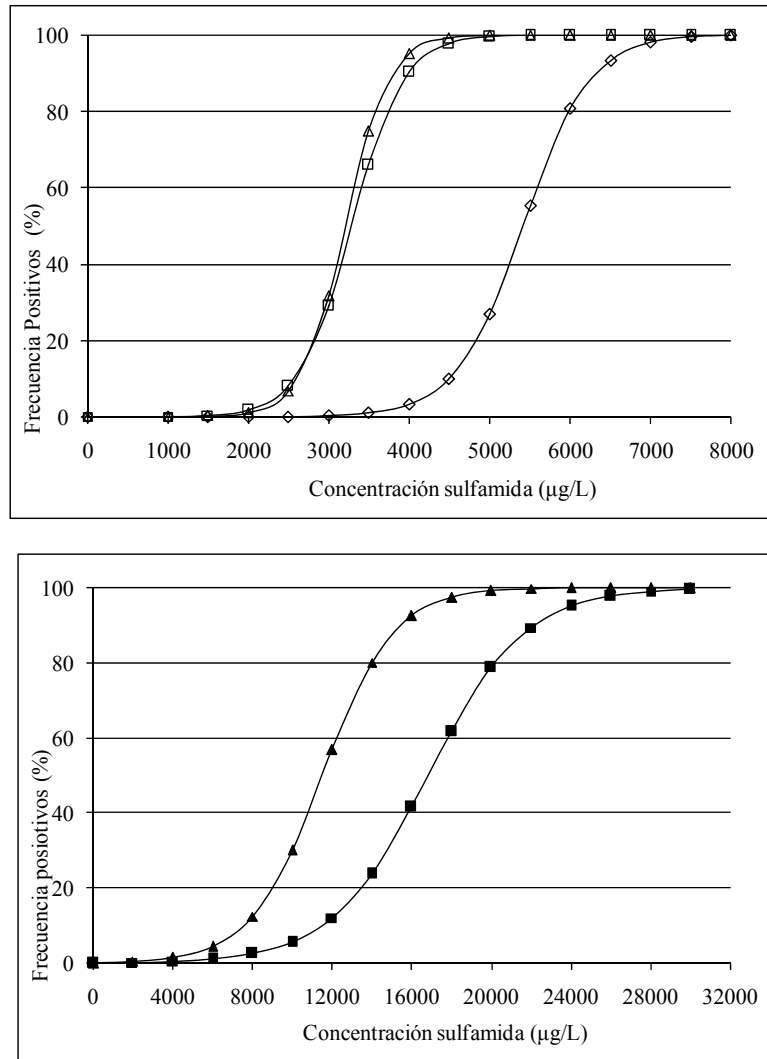


Figura IV.5. Curvas dosis-respuesta de las sulfamidas en leche para el bioensayo sin la adición de TMP en el medio de cultivo (▲: sulfadiazina, ◇: sulfadimetoxina, ■ : sulfametazina, Δ: sulfametoxazol, □: sulfatiazol).

Los LDs de las SAs en leche calculados mediante las ecuaciones de la tabla anterior, al igual que los LMRs establecidos por el UE se resumen en la Tabla IV.9.

Cuando se comparan los LDs de las SAs en leche para este bioensayo con los calculados para otros métodos de inhibición microbiológica que utilizan el mismo microorganismo de prueba y que no adicionan diaminopirimidinas, se observa que también resultan elevados. Así, el método BRT[®] AiM presenta LDs de 5400 µg/l de SDZ y 3200 µg/l de SMX en leche de oveja (Molina *et al.*, 2003). Por el contrario, Charm y Ruth (1993); Heeschen (1993) y Heeschen y Blüthgen (1995) señalan valores próximos a 1000 µg/l de SDZ en leche de vaca.

Para el método BRT[®] AiM, Frank (1995) determina rangos muy elevados para STZ (5000-10000 µg/l) y sulfamerazina (15000-50000 µg/l) que se alejan demasiado

del LMR (100 µg/l) al igual que los límites expuestos en la Tabla IV.9, mientras que Zorraquino (1997a) establece para SMZ en leche de vaca, LDs más bajos (4800-5100 µg/l) a los calculados en este trabajo.

Tabla IV.9. Límites de detección de sulfamidas en leche calculados para el bioensayo sin TMP en el medio de cultivo

Sulfamidas	Límite detección	LMR
Sulfadiazina	19400	100
Sulfadimetoxina	7100	100
Sulfametazina	25400	100
Sulfametoxazol	4130	100
Sulfatiazol	4360	100

Límite detección (µg/l), LMR: Límite Máximo de Residuo (µg/l).

Los LDs de las cinco SAs estudiadas (Cuadro IV.9) resultan muy elevados en comparación con sus LMRs establecidos por la legislación (100 µg/l). Por ello, este método resulta inadecuado para su detección, debido a la baja sensibilidad que posee *G. stearothermophilus* para residuos de estos antimicrobianos en la leche. Para solucionar este inconveniente, se procedió a evaluar la mejora del método mediante la incorporación de diaminopirimidina (“TMP”) en el medio de cultivo.

IV.1.3.2.2. Curvas dosis-respuesta de sulfamidas en leche para Bioensayo “BS” elaborado con TMP

La aplicación del modelo de regresión logística marcó efectos significativos para las concentraciones de SAs, “TMP” y las interacciones entre las concentraciones de SAs y los diferentes niveles de “TMP” presentes en el medio de cultivo, tal como se muestra en la Tabla IV.10. Las ecuaciones matemáticas que expresan la frecuencia de resultados positivos como una función de las concentraciones de SAs en leche y los niveles de TMP en el medio se resumen en la Tabla IV.11.

Se observa que, en todos los casos resultó significativa la interacción entre las SAs y el “TMP”, poniendo de manifiesto una acción sinérgica de ambos antimicrobianos. Los coeficientes de concordancia calculados mediante la aplicación del modelo de logístico para las cinco SAs fueron buenos, al estar comprendidos entre 99.3% (SDZ y SDM) y 99.7% (STZ).

Tabla IV.10. Valores de χ^2 y probabilidad para los diferentes factores contemplados en el modelo logístico interactivo en el bioensayo para SAs

Sulfamidas	[SAs]		[TMP]		[SAs]*[TMP]	
	Valor " χ^2 "	Valor "p"	Valor " χ^2 "	Valor "p"	Valor " χ^2 "	Valor "p"
Sulfadiazina	73.0125	0.0001	4.1541	0.0428	84.6685	0.0001
Sulfadimetoxina	63.4903	0.0001	16.3650	0.0001	76.6877	0.0001
Sulfametazina	57.5280	0.0001	9.3674	0.0023	78.9076	0.0001
Sulfametoxazol	49.4730	0.0001	10.6182	0.0001	58.7457	0.0001
Sulfatiazol	47.7602	0.0001	10.6449	0.0001	61.6649	0.0001

SAs: sulfamidas, TMP: trimetoprim.

Puede apreciarse en la Tabla IV.11 que, los valores de los coeficientes " β_2 " para el "TMP" resultaron positivos para las cinco SAs, poniendo de manifiesto su acción antimicrobiana cuando este antibiótico se encuentra presente en el medio de cultivo.

Tabla IV.11. Ecuaciones logísticas de las curvas dosis-respuestas de las sulfamidas para los bioensayos preparados con diferentes niveles de TMP

SAs	Logit [P] = $\beta_0 + \beta_1$ [SAs] + β_2 [TMP] + β_{12} [SAs]*[TMP]	C
SDZ	Logit [P] = -5.3275+0.0004[SDZ]+0.0214[TMP]+ 0.0004 [SDZ]*[TMP]	99.3
SDM	Logit [P] = -6.1398+0.0011[SDM] +0.0434[TMP]+0.0004[SDM]*[TMP]	99.3
SMZ	Logit [P] = -5.6971+0.0003 [SMZ] +0.0397[TMP]+0.0003[SMZ]*[TMP]	99.5
SMX	Logit [P] = -4.7858+0.0021[SMX]+ 0.0427[TMP]+0.0013[SMX]*[TMP]	99.6
STZ	Logit [P] = -7.7138+0.0023[STZ]+0.0417[TMP]+0.0010[STZ]*[TMP]	99.7

SAs: sulfamidas, TMP: trimetoprim, SDZ: sulfadiazina, SDM: sulfadimetoxina, SMZ: sulfametazina, SMX: sulfametoxazol, STZ: sulfatiazol, C: Coeficiente de concordancia porcentual.

Al analizar los coeficientes " β_{12} " de la Tabla IV.11, resulta evidente que la incorporación de "TMP" al medio de cultivo produce un efecto sinérgico para todas las SAs (valores positivos de " β_{12} ") que resultan más acentuados para SMX ($\beta_{12}=0.0013$) y STZ ($\beta_{12}=0.0010$) en comparación con el resto de las SAs ensayadas. Esta interacción positiva se hace notar mediante un incremento en la pendiente de las curvas dosis-respuestas en la medida que aumentan los niveles de "TMP" en el medio de cultivo.

Estos valores positivos en las interacciones entre SAs y "TMP" (coeficientes positivos de " β_{12} ", Tabla IV.11) revelan una acción sinérgica entre este antifolato y las SAs.

En grado de significación estadística ($p < 0.05$) de esta interacción ($[TMP] \times [SAs]$) queda demostrada mediante la implementación del modelo logístico. Según Jawetz y Gunnison (1952), el efecto sinérgico se pone de manifiesto por un incremento en la velocidad de su acción bactericida, tal como se aprecia en la Figura IV.6. En efecto, el incremento más marcado en la pendiente de la curva dosis-respuesta se produce para un nivel de 60 $\mu\text{g/l}$ de TMP. Este hecho pone en relieve un efecto bactericida cuando se utiliza la combinación de SAs y TMP.

Haciendo uso de las ecuaciones logísticas de las Tabla IV.11 y el criterio sugerido por IDF-FIL (2002), se calcularon los LDs de las cinco SAs para los bioensayos elaborados con diferentes niveles de TMP (Tabla IV.12).

Tabla IV.12. Efecto de las concentraciones de TMP sobre los límites de detección ($\mu\text{g/l}$) de SAs en leche

Sulfamidas	Concentración de TMP ($\mu\text{g/l}$)			LMR
	20	40	60	
Sulfadiazina	1220	780	320	100
Sulfadimetoxina	1100	620	380	100
Sulfametazina	1280	730	420	100
Sulfametoxazol	310	170	110	100
Sulfatiazol	570	290	160	100

TMP: trimetoprim, SDZ: sulfadiazina, SDM: sulfadimetoxina, SMZ: sulfametazina, SMX: sulfametoxazol, STZ: sulfatiazol, LMR: Límite Máximo de Residuo ($\mu\text{g/l}$).

Para cada una de las cinco sulfamidas analizadas, se observa una disminución en los niveles de detección del bioensayo conforme se incrementa la concentración de TMP en el medio de cultivo.

Considerando que el LMR establecido por la UE para SAs en leche es de 100 $\mu\text{g/L}$, la incorporación de 60 $\mu\text{g/L}$ de "TMP" permite obtener LDs próximos al LMR para SDM (380 $\mu\text{g/l}$), SMX (110 $\mu\text{g/l}$), STZ (160 $\mu\text{g/l}$) y no tan cercanos para SMZ (420 $\mu\text{g/l}$) y SDZ (320 $\mu\text{g/l}$).

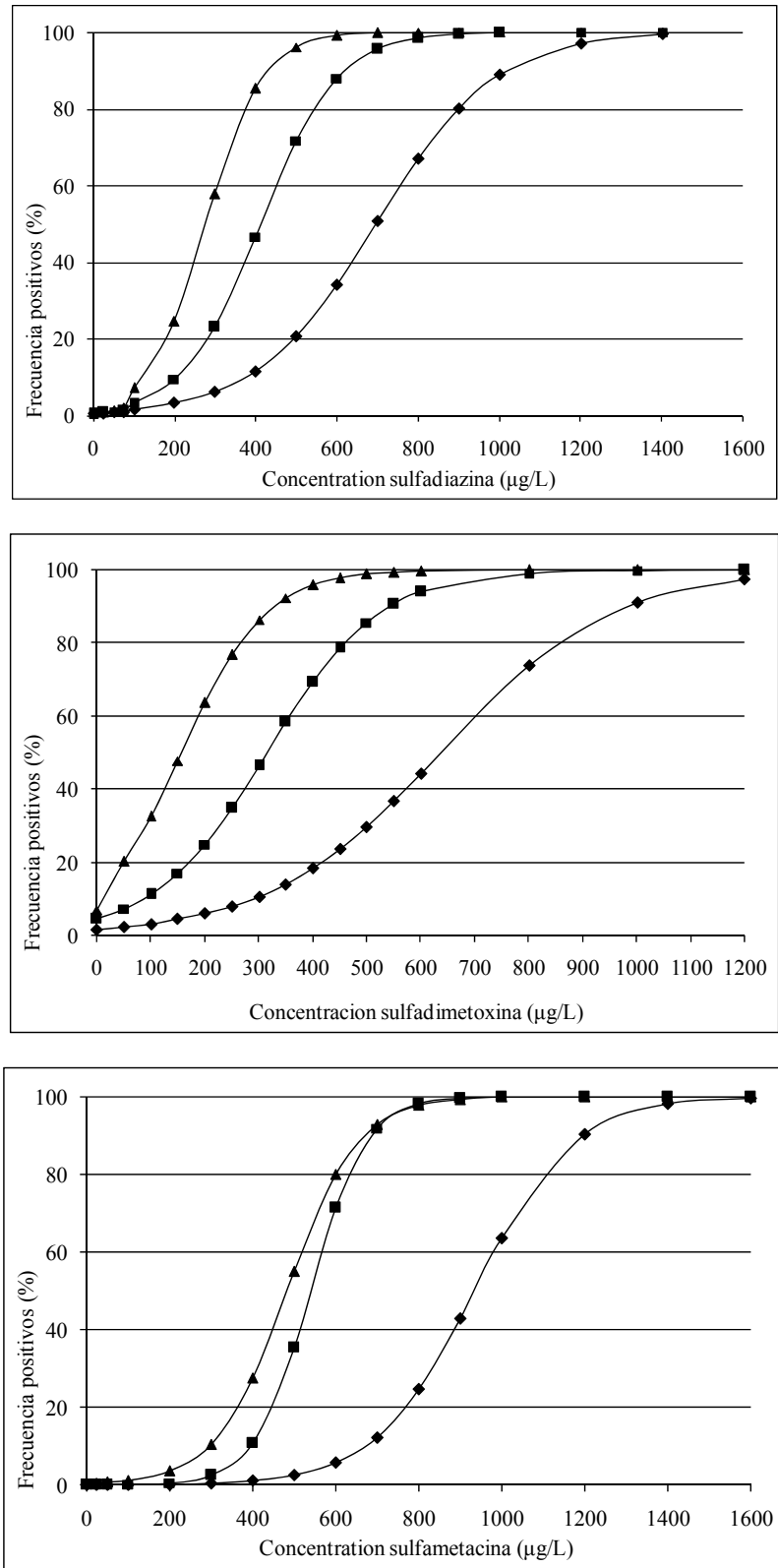


Figura IV.6. Curvas dosis-respuesta de las sulfamidas en leche para diferentes niveles de TMP en el medio de cultivo (♦: 20 µg/l, ■: 40 µg/l, ▲: 60 µg/l).

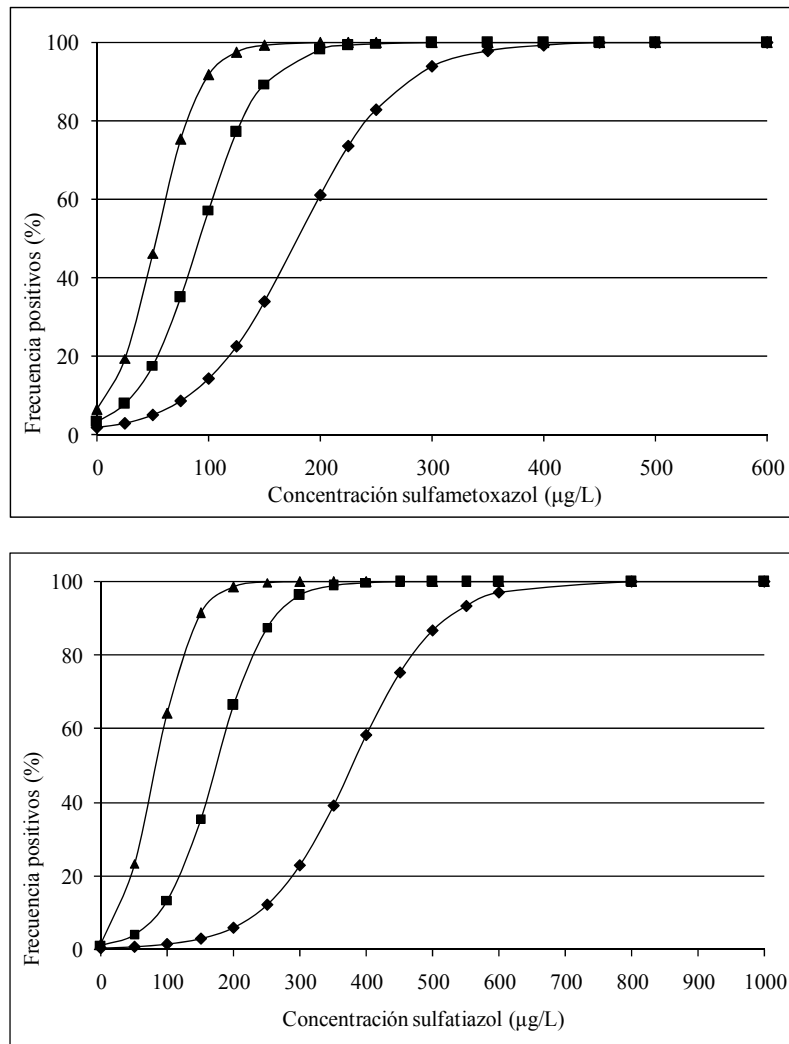


Figura IV.6 (cont). Curvas dosis-respuesta de las sulfamidas en leche para diferentes niveles de TMP en el medio de cultivo (◆: 20 µg/l, ■: 40 µg/l, ▲: 60 µg/l).

Se podría tratar de mejorar los límites de detección del bioensayo mediante la incorporación de mayores concentraciones de “TMP” en el medio de cultivo, sin embargo, el estudio previo de selectividad reveló que el uso de elevados niveles de “TMP” (80 µg/l) presenta un impacto negativo, al incrementar la frecuencia de resultados “falsos positivos”, es decir una disminución en la selectividad.

Los LDs del bioensayo fortificado con “TMP” resultan similares a los límites calculados para otros métodos microbiológicos que utilizan *G. stearotherophilus* suplementados con antifolatos, como el método Delvotest® "SP" que permite detectar 260 µg/l de SDM y 110 µg/l de SMX en leche de oveja (Althaus *et al.*, 2002). Aunque, Charm y Ruth (1993) señalan un nivel de detección de 1000 µg/l de SDZ. El método Eclipse® "100ov" detecta 170 µg/l de SDM, 750 µg/l de SMZ y 250 µg/l de STZ en leche de oveja (Montero *et al.*, 2004), valores cercanos a los LDs de la Tabla IV.12.

IV.1.4. RESULTADOS DEL SISTEMA MICROBIOLÓGICO EN MICROPLACA 1 (SMmp1)

El SMmp1 consta de dos métodos, Bioensayo “BT” que permite detectar residuos de betalactámicos y tetraciclinas y Bioensayo “BS” sensible a los betalactámicos y sulfamidas. A continuación se analizarán los LD de dicho sistema.

IV.1.4.1. Límites de detección de antibióticos betalactámicos en leche para el SMmp1

Los resultados obtenidos con el modelo logístico para los 10 betalactámicos analizados con Bioensayo “BT” y “BS”, se muestra en Tabla IV.13 y Tabla.IV.14.

Tabla IV.13. Ecuaciones logísticas de las curvas dosis respuestas de betalactámicos en leche analizadas con el Bioensayo “BT”

Betalactámicos	Logit [P] = $\beta_0 + \beta_1$ [Betalactámico]	C
<i>Penicilinas</i>		
Amoxicilina	Logit [P] = -11.3966 + 1.5185 [AMOX]	96.7
Ampicilina	Logit [P] = -14.7862 + 2.3659 [AMP]	98.5
Cloxacilina	Logit [P] = -13.1755 + 0.3835 [CLOX]	97.9
Oxacilina	Logit [P] = -18.4151 + 1.2483 [OXA]	98.6
Penicillina “G”	Logit [P] = -16.1514 + 6.1636 [PENG]	98.9
<i>Cefalosporinas</i>		
Cefadroxil	Logit [P] = -7.9435 + 0.0683 [CXL]	95.7
Cefalexina	Logit [P] = -10.0512 + 0.1313 [CLX]	97.4
Cefoperazone	Logit [P] = -11.0985 + 0.2277 [CPZ]	98.3
Ceftiofur®	Logit [P] = -12.1451 + 0.1438 [CFR]	98.8
Cefuroxime	Logit [P] = -13.07 + 0.3082 [CFU]	98.9

AMOX: amoxicilina, AMP: ampicilina, CLOX: cloxacilina, OXA: oxacilina, PENG: penicilina “G”, CXL: cefadroxil, CLX: cefalexina, CPZ: cefoperazone, CFR: ceftiofur, CFU: cefuroxime, C: Coeficiente de concordancia porcentual.

Se observa que penicilina “G” presenta mayor valor del coeficiente “ β_1 ”, seguido de ampicilina, amoxicilina, oxacilina y cloxacilina, tanto para Bioensayo “BT” ($\beta_{1,PENG} = 6.1636$, $\beta_{1,AMP} = 2.3659$, $\beta_{1,AMO} = 1.5185$, $\beta_{1,OXA} = 1.2483$ y $\beta_{1,CLOX} = 0.3835$) como Bioensayo “BS” ($\beta_{1,PENG} = 8.1827$, $\beta_{1,AMP} = 6.8009$, $\beta_{1,AMO} = 3.7160$, $\beta_{1,OXA} = 1.5409$ y $\beta_{1,CLOX} = 0.3371$).

Por el contrario, las cefalosporinas presentan menores valores de estos coeficientes. Este hecho pone de manifiesto una mayor sensibilidad por parte de *G. stearothermophilus* para detectar residuos de penicilinas que de cefalosporinas, ya que pequeños incrementos en sus concentraciones producen un marcado efecto sobre la variable respuesta (frecuencia de resultados positivos). Dentro de este grupo, cefuroxime y cefoperazone poseen mayor valor de " β_1 " que las demás cefalosporinas.

Tabla IV.14. Ecuaciones logísticas de las curvas dosis respuestas de betalactámicos en leche analizadas con el Bioensayo "BS"

Betalactámicos	Logit [P] = $\beta_0 + \beta_1$ [Betalactámico]	C
<i>Penicilinas</i>		
Amoxicilina	Logit [P] = -15.8159 + 3.7160 [AMOX]	97.7
Ampicilina	Logit [P] = -21.6358 + 6.8009 [AMP]	99.1
Cloxacilina	Logit [P] = -10.9673 + 0.3371 [CLOX]	97.5
Oxacilina	Logit [P] = -22.3155 + 1.5409 [OXA]	98.9
Penicilina "G"	Logit [P] = -22.5024 + 8.1827 [PENG]	99.4
<i>Cefalosporinas</i>		
Cefadroxil	Logit [P] = -16.0260 + 0.0970 [CXL]	97.5
Cefalexina	Logit [P] = -9.9664 + 0.0767 [CLX]	97.0
Cefoperazone	Logit [P] = -12.6755 + 0.1669 [CPZ]	97.9
Ceftiofur [®]	Logit [P] = -6.7069 + 0.0841 [CFR]	94.3
Cefuroxime	Logit [P] = -20.0044 + 0.1321 [CFU]	99.6

AMOX: amoxicilina, AMP: ampicilina, CLOX: cloxacilina, OXA: oxacilina, PENG: penicilina "G", CXL: cefadroxil, CLX: cefalexina, CPZ: cefoperazone, CFR: ceftiofur, CFU: cefuroxime, C: Coeficiente de concordancia porcentual.

Cuando se comparan los coeficientes " β_1 " de las penicilinas de Bioensayo "BT" (con "CAP", Tabla IV.13) con los valores de Bioensayo "BS" (con "TMP", Tabla IV.14) se observa que las penicilinas presentan mayores coeficientes " β_1 " para el segundo bioensayo (a excepción de la cloxacilina), mientras que para las cefalosporinas, ocurre lo contrario (a excepción del cefadroxil). Este hecho podría atribuirse a una diferencia en la forma de acción de los antimicrobianos suplementados ("CAP" y "TMP"), según se analizan muestras de leche que contengan penicilinas o cefalosporinas.

También se aprecia que los ajustes logrados mediante el modelo logístico fueron buenos, ya que los coeficientes de concordancia se encuentran comprendidos entre 94.3% para ceftiofur[®] y 99.6% para cefuroxime, analizados con Bioensayo "BS".

Con el propósito de visualizar las curvas dosis-respuesta de los antibióticos betalactámicos en leche cuando se emplea el SMmp1, se construyeron Figura IV.7 (penicilinas) - Figura IV.8 (cefalosporinas) para Bioensayo "BT" y Figura IV.9 (penicilinas) - Figura IV.10 (cefalosporinas) para Bioensayo "BS". En ellas se muestra el efecto de las concentraciones de betalactámicos sobre las frecuencias relativas de resultados positivos para cada método.

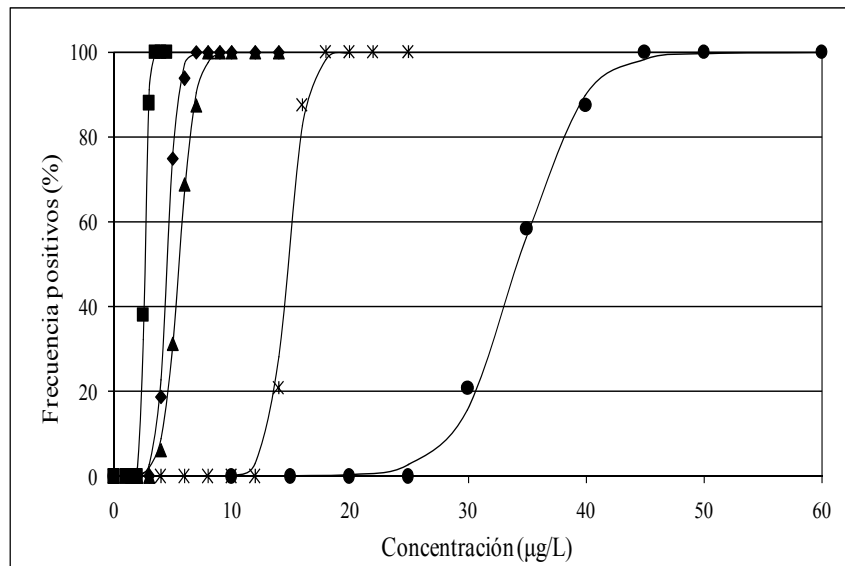


Figura IV.7. Curvas dosis respuestas de penicilinas en leche analizadas con Bioensayo "BT" (▲: amoxicilina, ◆: ampicilina, ●: cloxacilina, x: oxacilina, ■: penicilina "G").

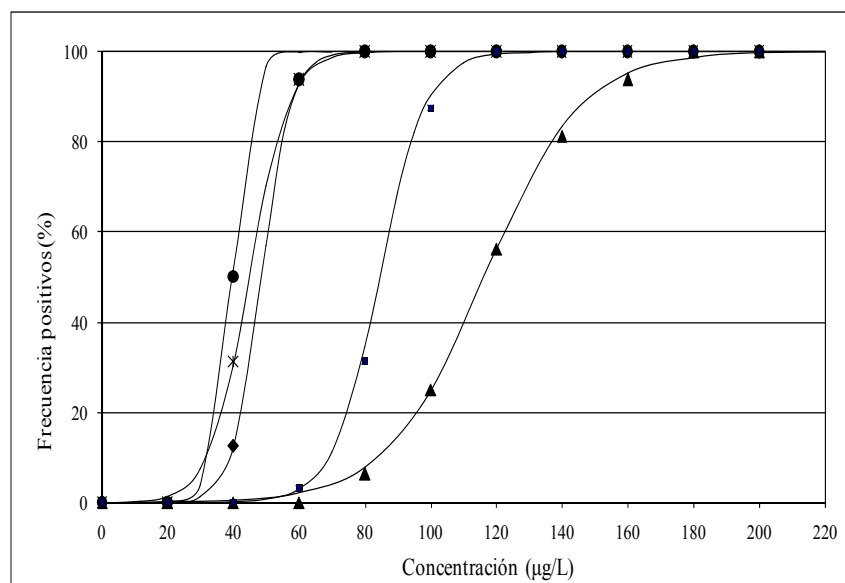


Figura IV.8. Curvas dosis respuestas de cefalosporinas de leche analizadas con Bioensayo "BT" (▲: cefadroxil, x: cefalexina, ◆: cefoperazone, ■: ceftiofur®, ●: cefuroxime).

Según Figura IV.7 y Figura IV.9, pequeños incrementos en las concentraciones de penicilina “G”, ampicilina y amoxicilina permiten alcanzar el 100% de resultados positivos (mayores valores de los coeficientes “ β_1 ”), mientras que la cloxacilina muestra una curva dosis-respuesta más suave que las anteriores.

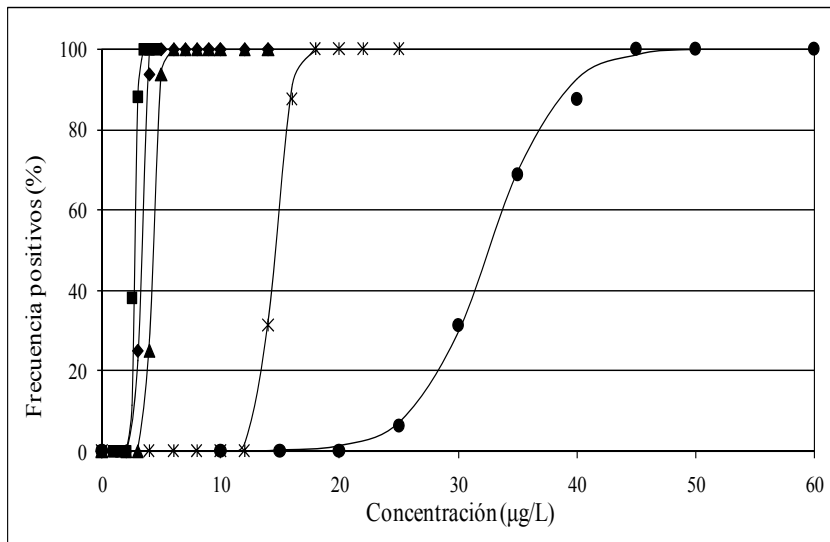


Figura IV.9. Curvas dosis respuestas de penicilinas en leche analizadas con Bioensayo “BS” (▲: amoxicilina, ◆: ampicilina, ●: cloxacilina, x: oxacilina, ■: penicilina “G”).

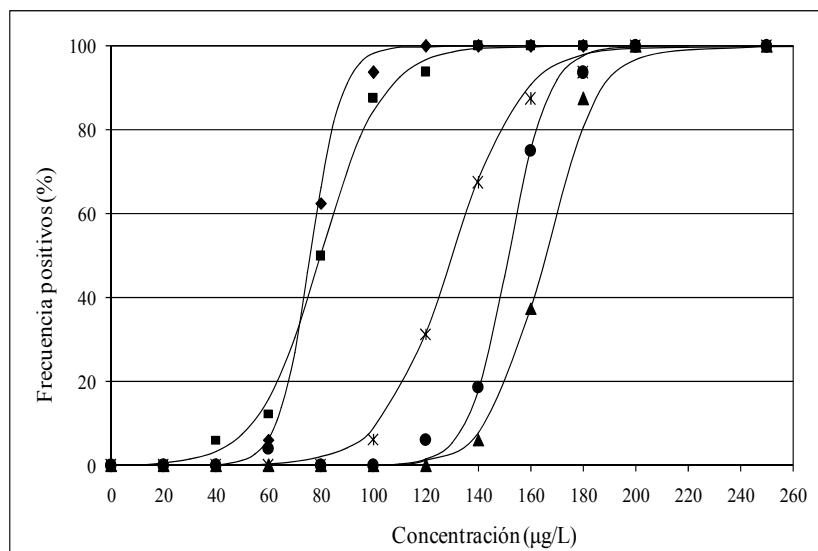


Figura IV.10. Curvas dosis respuestas de cefalosporinas de leche analizadas con Bioensayo “BS” (▲: cefadroxil, x: cefalexina, ◆: cefoperazone, ■: ceftiofur®, ●: cefuroxime).

Un comportamiento similar se observa para cefoperazone y cefuroxime, ya que poseen mayores coeficientes “ β_1 ”, tanto en Bioensayo “BT” ($\beta_{1,CPZ} = 0.2277$, $\beta_{1,CFU} = 0.3082$) como en Bioensayo “BS” ($\beta_{1,CPZ} = 0.1669$, $\beta_{1,CFU} = 0.1321$). Por ello, sus curvas dosis-respuestas crecen más rápido en comparación con las otras cefalosporinas estudiadas.

La Tabla IV.15 resume los límites de detección del SMmp1 calculados para los 10 antibióticos betalactámicos mediante las ecuaciones de Tabla IV.13, Tabla IV.14 y el criterio del 95% (IDF-FIL, 2002).

Tabla IV.15. Límites de detección de betalactámicos en leche para el SMmp1

Betalactámicos	Límites de detección del SMmp1		LMR
	Bioensayo “BT”	Bioensayo “BS”	
<i>Penicilinas</i>			
Amoxicilina	9	5	4
Ampicilina	7	4	4
Cloxacilina	42	40	30
Oxacilina	17	16	30
Penicilina “G”	3	3	4
<i>Cefalosporinas</i>			
Cefadroxil	159	190	-
Cefalexina	99	160	100
Cefoperazone	62	94	50
Ceftiofur [®]	105	115	100
Cefuroxime	52	170	-

LD: Límite de detección ($\mu\text{g/l}$), LMR: Límite Máximo de Residuo ($\mu\text{g/l}$).

Los LDs de las 5 penicilinas son inferiores a los observados para las 5 cefalosporinas, tanto para Bioensayo “BT” como para Bioensayo “BS”, debido a la mayor sensibilidad que presenta *G. stearothermophilus* para el primer grupo de antibióticos, en comparación con el otro.

Cuando se comparan los LDs de cada antibiótico con sus correspondientes LMRs, resulta evidente que el SMmp1 permite detectar residuos de ampicilina penicilina “G”, oxacilina, cloxacilina, cefalexina, ceftiofur[®] y cefoperazone en leche a niveles cercanos a sus respectivos LMRs (<2LMRs), mientras que la amoxicilina debe

estar presente en la leche a una concentración de 9 µg/l para que Bioensayo “BT” pueda detectarla.

Los LDs calculados para la amoxicilina mediante el SMmp1 son similares a los obtenidos por Charm y Ruth (1993) y Zorraquino (1997a, 1998) cuando utilizan el método BRT[®] AiM (5 µg/l), aunque Zaadhof *et al.* (1997) informaron un LD para esta penicilina comprendido entre 20 y 30 µg/l, superior al obtenido para el SMmp1.

Para el método Delvotest[®] SP, Tramontin *et al.* (1992), Honkanen-Buzalski y Reybroech (1995) y Lacroix (1995) obtienen para la amoxicilina, niveles de detección próximos (4, 6 y 3 µg/l, respectivamente) a los reportados para el SMmp1, aunque otros autores (Senyk *et al.*, 1989; Charm y Ruth, 1993; Gardner *et al.*, 1996 y Sischo, 1996) señalan límites de detección comprendidos entre 10 y 18 µg/l.

Los métodos Copan[®] CH-ATK Test y Eclipse[®] 100 presentan límites de detección de amoxicilina levemente inferiores a los determinados en este trabajo (>2LD y >4LD, respectivamente), según los reportes de las casas fabricantes (Roca *et al.*, 2007).

En forma similar, la ampicilina presentó un LD en el SMmp1 similares a los valores señalados por otros autores (Heeschen, 1993; Heeschen y Blüthgen, 1995; Zorraquino, 1997a, 1998) para el método BRT[®] AiM (5 µg/l), aunque Charm y Ruth (1993) y Jackson (1988) reportan un valor de 10 µg/l, levemente superior al presentado en Tabla IV.15.

Cuando muestras de leche que contienen residuos de ampicilina son analizadas por el método Delvotest[®] SP, Luitz *et al.* (1996) y Lacroix (1995) señalan niveles más bajos (3 y 4 µg/l, respectivamente), sin embargo otros autores (Smink, 1979; Senyk *et al.*, 1989; Van Os y Beukers, 1989; Charm y Ruth, 1993; Honkanen-Buzalski y Reybroech, 1995; Gardner *et al.*, 1996 y Sischo, 1996) obtienen para el método Delvotest[®] SP, niveles de detección más elevados (6-10 µg/l) y similares a los determinados en este trabajo para SMmp1. Por su parte, los métodos Copan[®] CH-ATK Test y Eclipse[®] 100 presentan para ampicilina límites de 2-4 y 5 µg/l, respectivamente (Roca *et al.*, 2007).

Con respecto a los residuos de cloxacilina, los límites de detección (42 µg/l y 40 µg/l) del SMmp1 resultaron similares a su LMR y a los niveles (40-50 µg/l) publicados por diferentes autores (Jaskch, 1988; Heeschen, 1993; Heeschen y Blüthgen, 1995; Zorraquino, 1997 y Analytic in Milch, 1998a), aunque Charm y Ruth (1993) calcularon un valor superior (100 µg/l) para el método BRT[®] AIM.

Cuando se emplea el método microbiológico Delvotest[®] SP, cloxacilina es detectada en un rango de 20-30 µg/l (Van Os y Beukers, 1980; Honkanen-Buzalski y Reybroech, 1995; Lacroix, 1995; Gardnen *et al.*, 1996 y Luitz *et al.*, 1996). No obstante, otros estudios señalan LDs más cercanos a los valores obtenidos con el SMmp1, tales como 35 µg/l (Smink, 1979), 50 µg/l (Charm y Ruth, 1993) y 41-81 µg/l (Senyk *et al.*, 1990).

Los LDs de la penicilina "G" (antibiótico más utilizado en el ganado bovino de leche) calculados para el SMmp1 resultaron similares a su LMR, aunque otros autores obtienen niveles inferiores para el método BRT[®] AiM, tales como 1.5 µg/l (Heeschen y Blüthgen, 1995) y los rangos de 1-2 µg/l (Frank, 1995), 2-3 µg/l (Zaadhof *et al.*, 1997) y 2-3 µg/l (Zorraquino, 1997a, 1998), por el contrario Jaskch (1988), Charm y Ruth (1993) y Heeschen (1993) indican valores de LDs de penicilina "G" superiores (6 a 10 µg/l).

Cuando se utiliza el método Delvotest[®] SP el LD de la penicilina "G" en leche fue de 3 µg/l y resulta similar (Tramontin *et al.*, 1992; Charm y Ruth, 1993; Honkanen-Buzalski y Reybroech, 1995; Lacroix, 1995; Garnden *et al.*, 1996; Sischo, 1996; Zaadhof *et al.*, 1997) a las 3 µg/l determinados para el SMmp1, aunque Smink (1979) obtiene un valor superior (6 µg/l) para residuos de penicilina "G" analizados por Delvotest[®] SP. Los métodos Copan[®] CH-ATK Test y Eclipse[®] 100 – 50 poseen LDs de 1-2 y 4 µg/l, respectivamente (Roca *et al.*, 2007).

Para las penicilinas, los trabajos realizados en leche de oveja señalan límites similares para el método BRT[®] AiM (6 µg/l de amoxicilina, 6 µg/l de ampicilina, 51 µg/l de cloxacilina) según Molina *et al.* (2003), el método Delvotest[®] SP (5 µg/l de amoxicilina, 3 µg/l de ampicilina y 23 µg/l de cloxacilina) acorde a los estudios de Althaus *et al.* (2002) y el método Eclipse[®] 100ov (7 µg/l de amoxicilina, 5 µg/l de penicilina "G", 68 µg/l de cloxacilina y 28 µg/l de oxacilina) como lo señalan Montero *et al.* (2005).

Respecto a las cefalosporinas, se debe destacar que ceftiofur[®] presentó LDs en el SMmp1 (Tabla IV.15) similares a las 100 µg/l calculados por Charm y Ruth (1993) para el método BRT[®] AiM, aunque Zorraquino (1997a, 1998) obtiene valores más elevados (150 a 200 µg/l) para este método. Al emplear el método Delvotest[®] SP para detectar residuos de ceftiofur[®] en leche de vaca, Charm y Ruth (1993); Honkanen-Buzalski y Reybroech (1995); Lacroix (1995); Gardnen *et al.*, (1996) y Sischo (1996) indican niveles más bajos (50 µg/l) al calculado para el SMmp1, mientras que el método Copan[®] CH-ATK Test muestra un rango 50-100 µg/l.

Los LDs del cefoperazone en leche para el SMmp1 resultan similar a las 80 µg/l señaladas por Jaskch (1988) para el método BRT[®] AiM, sin embargo, Zorraquino (1997a, 1998) obtiene un valor inferior (42 µg/l) para este método. Este autor obtiene para la cefalexina un LD (270 µg/l) superior al expuesto en la Tabla IV.15 para el SMmp1. En lo que se refiere a los LD del cefadroxil y cefuroxime, se debe destacar que no se han encontrado valores de referencia en la bibliografía consultada.

También los límites de la Tabla IV.15 resultaron similares a los niveles detectados en leche de oveja cuando utiliza el método BRT[®] AiM (230 µg/l cefadroxil; 270 µg/l de cefalexina, 92 µg/l de cefoperazone, 120 µg/l de Ceftiofur[®] y 69 µg/l de cefuroxime) por Molina *et al.*, (2003), al emplear el método Delvotest[®] SP (63 µg/l de cefadroxil, 68 µg/l de cefalexina, 41 µg/l de cefoperazone, 59 µg/l de ceftiofur[®] y 41 µg/l de cefuroxime) y por Althaus *et al.* (2002) cuando se utiliza el método Eclipse[®] 100 ov (86 µg/l de cefadroxil, 115 µg/l de cefalexina, 110 µg/l de cefoperazone y 85 µg/l de cefuroxime) según Montero *et al.* (2005).

IV.1.4.1.2. Límites de detección de sulfamidas en leche para el SMmp1

Las expresiones matemáticas que representan las curvas dosis-respuesta de las interpretaciones visuales de los Bioensayo “BT” y “BS” empleados con muestras de leche que contienen sulfamidas se exponen en Tabla IV.16 y Tabla IV.17, respectivamente.

Tabla IV.16. Ecuaciones logísticas de las curvas dosis respuestas de sulfamidas en leche analizadas con Bioensayo “BT”

Sulfamidas	Logit [P] = $\beta_0 + \beta_1$ [SAs]	C
Sulfadiazina	Logit [P] = -8.2241 + 0.00023 [SDZ]	95.0
Sulfadimetoxina	Logit [P] = -18.8281 + 0.00178 [SDM]	98.7
Sulfametazina	Logit [P] = -19.1576 + 0.00074 [SMZ]	99.4
Sulfametoxazol	Logit [P] = -16.7196 + 0.00145 [SMX]	97.9
Sulfatiazol	Logit [P] = -20.2747 + 0.00174 [STZ]	98.6

SAs: sulfamidas, SDZ: sulfadiazina, SDM: sulfadimetoxina, SMZ: sulfametazina, SMX: sulfametoxazol, STZ: sulfatiazol, C: Coeficiente de concordancia porcentual.

Se aprecia que los ajustes alcanzados mediante la implementación del modelo de regresión logística fueron buenos, al estar comprendidos entre 86.4% y 99.4% para SMZ (Bioensayo “BS” y Bioensayo “BT”, respectivamente).

Los coeficientes “ β_1 ” de las sulfamidas calculados mediante el modelo logístico fueron más bajos para Bioensayo “BT” (Tabla IV.16) en comparación con Bioensayo “BS” (Tabla IV.17) y los obtenidos para los antibióticos betalactámicos (Tabla IV.13 y Tabla IV.14), debido a la baja sensibilidad que presenta *G. stearothermophilus* para detectar residuos de estos antimicrobianos en leche, al no contener antifolatos en el medio de cultivo.

Tabla IV.17. Ecuaciones logísticas de las curvas dosis respuestas de sulfamidas analizadas con Bioensayo BS

Sulfamidas	Logit [P] = $\beta_0 + \beta_1$ [SAs]	C
Sulfadiazina	Logit [P] = -22.089 + 0.1525 [SDZ]	91.0
Sulfadimetoxina	Logit [P] = -11.9029 + 0.0577 [SDM]	90.0
Sulfametazina	Logit [P] = -17.7909 + 0.0342 [SMZ]	86.4
Sulfametoxazol	Logit [P] = -11.0868 + 0.1167 [SMX]	89.3
Sulfatiazol	Logit [P] = -9.0399 + 0.1246 [STZ]	89.3

SAs: sulfamidas, SDZ: sulfadiazina, SDM: sulfadimetoxina, SMZ: sulfametazina, SMX: sulfametoxazol, STZ: sulfatiazol, C: Coeficiente de concordancia porcentual.

Además, se debe destacar que los mayores valores de los términos “ β_1 ” se obtuvieron para residuos de sulfadiazina, sulfametoxazol y sulfatiazol analizados con Bioensayo “BS”. Las magnitudes de estos términos (“ β_1 ”) resultan similares a los observados para los residuos de cefalosporinas en leche evaluados con el SMmp1 (Tabla IV.13 y Tabla IV.14).

Haciendo uso de las ecuaciones de Tabla IV.16 y Tabla IV.17 se construyeron Figura IV.11 y Figura IV.12 donde se visualiza el efecto de las concentraciones de sulfamidas sobre las frecuencias de resultados positivos a Bioensayo “BT” y “BS”, respectivamente.

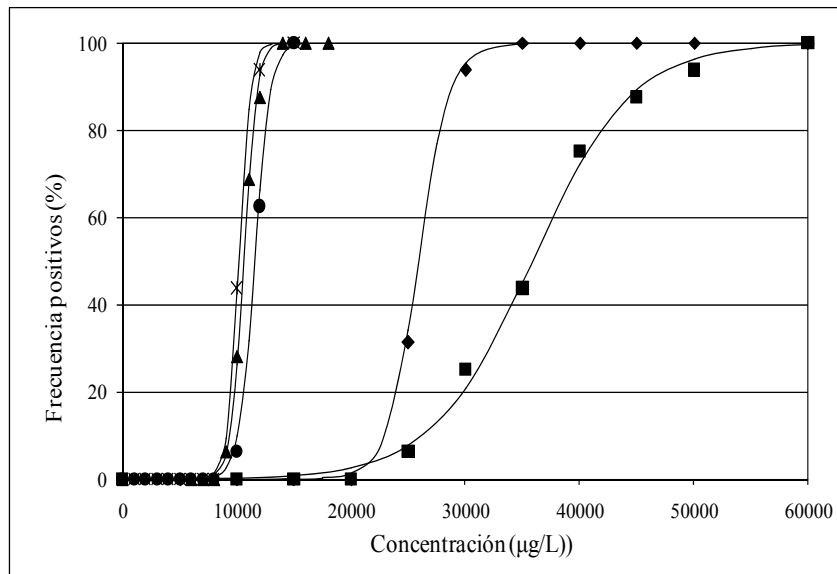


Figura IV.11. Curvas dosis respuestas de sulfamidas en leche analizadas con Bioensayo "BT" (■: sulfadiazina, ▲: sulfadimetoxina, ◆: sulfametazina, ●: sulfametoxazol, x: sulfatiazol).

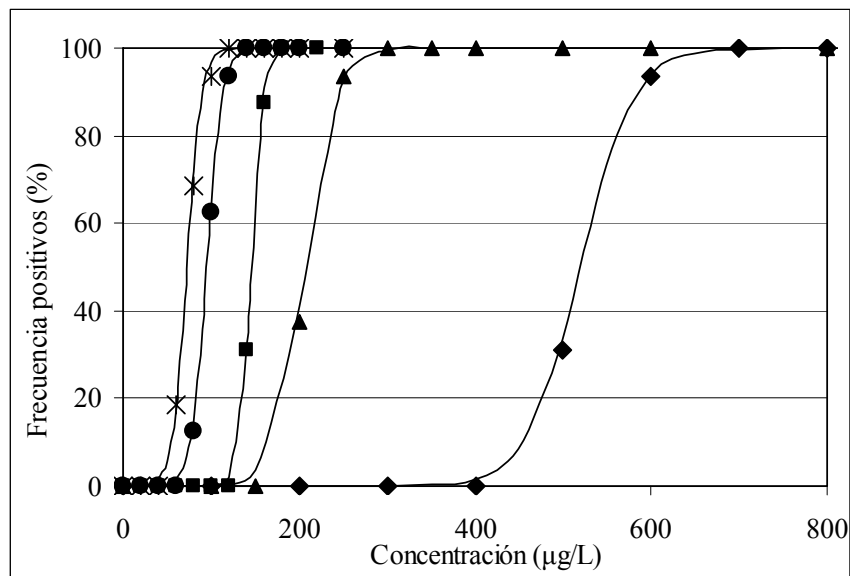


Figura IV.12. Curvas dosis respuestas de sulfamidas en leche analizadas con Bioensayo "BS" (■: sulfadiazina, ▲: sulfadimetoxina, ◆: sulfametazina, ●: sulfametoxazol, x: sulfatiazol,).

Se requieren concentraciones de 10000 µg/l de sulfadimetoxina, sulfametoxazol o sulfatiazol para producir un 100% de resultados positivos al Bioensayo "BT", mientras que sulfametazina (35000 µg/l) y sulfadiazina (60000 µg/l) deben estar presentes en la leche a mayores concentraciones para que Bioensayo "BT" pueda detectarlas.

Por el contrario, para producir el 100% de resultados positivos a Bioensayo “BS” serán necesarios niveles de sulfadiazina, sulfametoxazol y sulfatiazol en leche inferiores a las 100 µg/l, mientras que sulfametazina y sulfadimetoxina deberán estar presentes a concentraciones cercanas a las 450 µg/l. Estas discrepancias entre los dos métodos, pone de manifiesto la ausencia de una especificidad cruzada para los residuos de sulfamidas, ya que serán detectados por Bioensayo “BS”, mientras que Bioensayo “BT” no podrá detectarlas.

En la Tabla IV.18 se resumen los LD calculados mediante el criterio del 95% de resultados positivos para las cinco sulfamidas evaluadas mediante el SMmp1. Se observa que los LDs resultaron más elevados cuando las determinaciones se efectúan con Bioensayo “BT” que al emplear Bioensayo “BS”.

Además, para este último método, sulfadiazina, sulfametoxazol y sulfatiazol presentaron límites de detección cercanos a sus LMR (100 µg/l), mientras que los LDs de sulfadimetoxina y sulfametazina fueron superiores a su LMR.

Tabla IV.18. Límites de detección de sulfamidas en leche para el SMmp1

Sulfamidas	Límites de detección del SMmp1		LMR
	Bioensayo “BT”	Bioensayo “BS”	
Sulfadiazina	49000	164	100
Sulfadimetoxina	12000	260	100
Sulfametazina	30000	610	100
Sulfametoxazol	14000	120	100
Sulfatiazol	13000	100	100

LD: Límite de detección (µg/l), LMR: Límite Máximo de Residuo (µg/l).

Para métodos que emplean *G. stearothermophilus* sin la incorporación de antifolatos en el medio de cultivo, se debe mencionar que otros autores han determinado LDs elevados cuando utilizan el método BRT[®] AiM. Así, Frank (1995) señala rangos de 5000-10000 µg/l para STZ y 15000-50000 µg/l para SMZ, mientras que Zorraquino (1997a) establece para esta sulfamida en leche de vaca un rango de 4800-5100 µg/l, todos ellos similares al observado para el Bioensayo “BT” sin la fortificación con “TMP” en el medio del cultivo.

En leche de oveja, cuando se utiliza el método BRT[®] AiM que no contiene diaminopiridinas en el medio, Molina *et al.* (2003) calculan LDs elevados para SDZ

(5400 µg/l), SMX (3200 µg/l), sulfametoxipiridazina (6500 µg/l) y sulfaquinoxalina (6200 µg/l) similares a los presentados para el Bioensayo "BT" en la Tabla IV.18.

Por el contrario, para métodos fortificados con antifolatos, los LDs del Bioensayo "BS" (Tabla IV.18) fueron similares a los calculados para los métodos Delvotest® "SP" (260 µg/l de SDM y 110 µg/l de SMX) según Althaus *et al.* (2002), Copan CH-ATK® Test (50-100 µg/l de STZ, 50-100 µg/l de SDZ 100-200 µg/l de SMT) y Eclipse® "100ov" (170 µg/l de SDM, 750 µg/l de SMZ y 250 µg/l de STZ) según el estudio efectuado por Montero *et al.*, (2004).

IV.1.4.1.3. Límites de detección de tetraciclinas en leche para el SMmp1

Tabla IV.19 y Tabla IV.20 resumen los resultados de la aplicación del modelo logístico a las interpretaciones visuales de las curvas dosis-respuestas de las TCs en leche analizadas con Bioensayo "BT" y Bioensayo "BS", respectivamente.

Tabla IV.19. Ecuaciones logísticas de las curvas dosis respuestas de tetraciclinas en leche analizadas con Bioensayo "BT"

Tetraciclinas	Logit [P] = $\beta_0 + \beta_1$ [TCs]	C
Clortetraciclina	Logit [P] = -9.4066 + 0.0456 [CTC]	90.7
Oxitetraciclina	Logit [P] = -10.8242 + 0.0933 [OTC]	89.3
Tetraciclina	Logit [P] = -9.0156 + 0.0627 [TC]	89.8

TCs: tetraciclinas, CTC: clortetraciclina, OTC: oxitetraciclina, TC: tetraciclina, C: Coeficiente de concordancia porcentual.

Los coeficientes de concordancia fueron adecuados, al estar comprendidos entre 89.3% (OTC con Bioensayo "BT") y 99.4% (TC con Bioensayo "BS"). Los términos " β_1 " para las TCs analizadas con Bioensayo "BT" (Tabla IV.19) fueron superiores a los calculados para Bioensayo "BS" (Tabla IV.20). Esta virtud, permitirá disminuir los inconvenientes de especificidad cruzada de las tetraciclinas al implementar el SMmp1.

Figura IV.13 y Figura IV.14 visualizan el efecto de las concentraciones de TCs presentes en las muestras de leche sobre las frecuencias relativas de resultados positivos a Bioensayo "BT" y Bioensayo "BS".

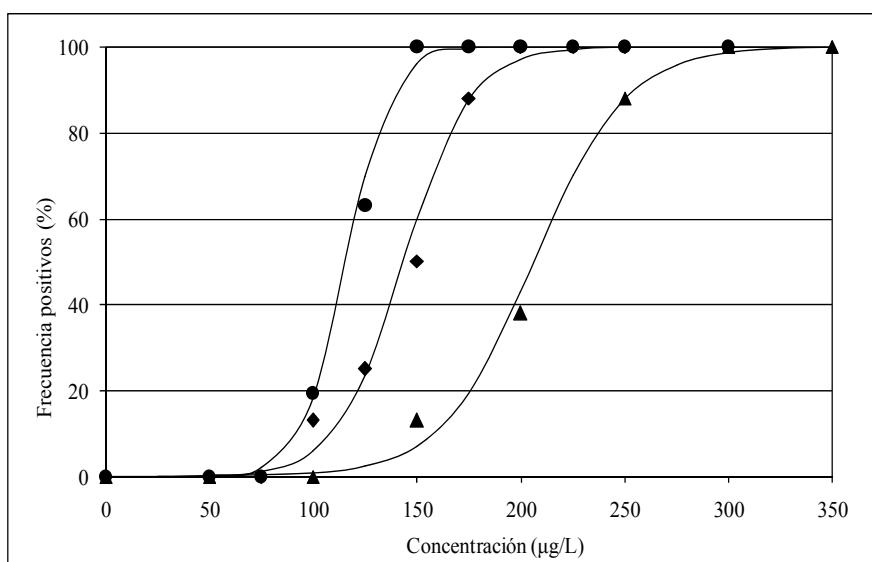
Tabla IV.20. Ecuaciones logísticas de las curvas dosis respuestas de tetraciclinas en leche analizadas con Bioensayo “BS”

Tetraciclinas	Logit [P] = $\beta_0 + \beta_1$ [TCs]	C
Clortetraciclina	Logit [P] = -10.1408 + 0.0036 [CTC]	97.7
Oxitetraciclina	Logit [P] = -9.9616 + 0.0153 [OTC]	97.0
Tetraciclina	Logit [P] = -26.5938 + 0.0409 [TET]	99.4

TCs: tetraciclinas, CTC: clortetraciclina, OTC: oxitetraciclina, TC: tetraciclina, C: Coeficiente de concordancia porcentual.

Para Bioensayo “BT”, concentraciones de 150 $\mu\text{g/l}$ de OTC y TC producen un 100% de resultados positivos, mientras que CTC debe estar presente a concentraciones más elevadas (350 $\mu\text{g/l}$). Por el contrario, para visualizar cambios en la respuesta de Bioensayo “BS”, oxitetraciclina y tetraciclina deben hallarse en la leche a una concentración de 1000 $\mu\text{g/l}$ y clortetraciclina a 4500 $\mu\text{g/l}$.

Los LDs calculados mediante las ecuaciones logísticas (Tabla IV.19 y Tabla IV.20) se muestran en la Tabla IV.21. Para Bioensayo “BT”, se observa que CTC presentó un valor más elevado en su LD que OTC y TC. Este hecho obedece a su menor valor del coeficiente “ β_1 ” (0.0456) en comparación con las otras tetraciclinas (Tabla IV.19).

**Figura IV.13.** Curvas dosis respuestas de tetraciclinas de leche analizadas con Bioensayo “BT” (▲: clortetraciclina, ◆: tetraciclina, ●: oxitetraciclina)

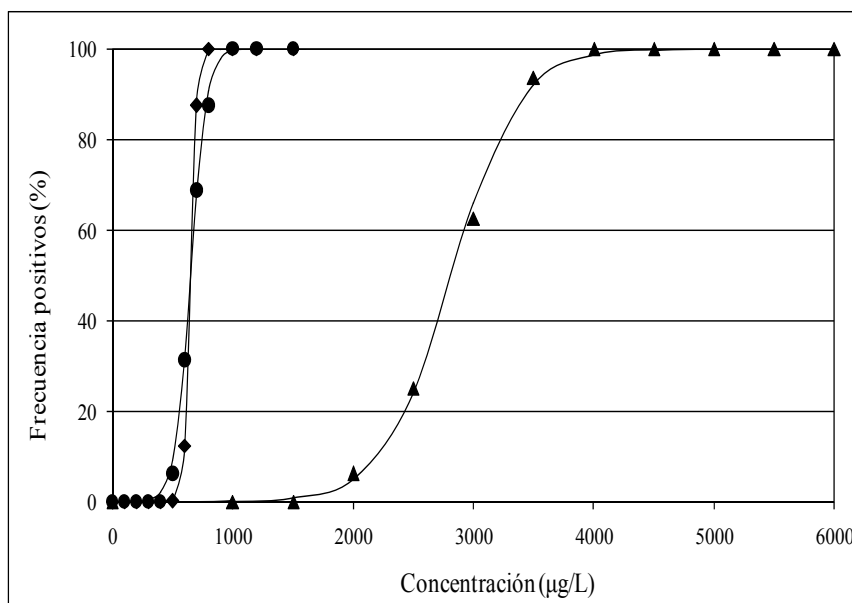


Figura IV.14. Curvas dosis respuestas de tetraciclinas de leche analizadas con Bioensayo “BS” (▲: clortetraciclina, ◆: tetraciclina, ●: oxitetraciclina).

Tabla IV.21. Límites de detección de tetraciclinas en leche para el SMmp1

Tetraciclina	Límites de detección del SMmp1		LMR
	Bioensayo “BT”	Bioensayo “BS”	
Clortetraciclina	275	3600	100
Oxitetraciclina	150	850	100
Tetraciclina	158	720	100

LD: Límite de detección (µg/l), LMR: Límite Máximo de Residuo (µg/l).

Al respecto, se debe destacar que otros bioensayos que utilizan Müller Hinton como medio de cultivo e indicador de óxido-reducción negro brillante también presentan altos niveles de detección para las TCs, como por ejemplo el método BRT[®] AiM que divisa 2000-5000 µg/l de TC (Frank, 1995), o 1500-5000 µg/l de OTC (Frank, 1995). De igual forma, Molina *et al.* (2003) detectan valores elevados (5500 µg/l de OTC y 6200 µg/l de TC) para el método BRT[®] AiM con muestras de leche de oveja.

Cuando se comparan los LDs de las TCs obtenidas por Bioensayo “BT” (fortificado con 400 µg/l de “CAP”) con los LDs calculados para Bioensayo “BS” (Tabla IV.21), se aprecia que el primer método posee mayor sensibilidad que el segundo. De este modo, las TCs serán detectadas por Bioensayo “BT” y no por Bioensayo “BS”, disminuyendo de este modo los inconvenientes asociados a una posible especificidad cruzada.

IV.1.4.1.4. Límites de detección de otros agentes antimicrobianos en leche para el SMmp1

Con el propósito de analizar la respuesta del SMmp1 para otros agentes antimicrobianos diferentes a los antibióticos antes estudiados, se llevaron a cabo los estudios de especificidad cruzada con muestras de leche fortificadas con aminoglucósidos, macrólidos y quinolonas. En Tabla IV.22 y Tabla IV.23 se exponen las ecuaciones que expresan las curvas dosis-respuestas obtenidas mediante la aplicación del modelo de regresión logístico a las calificaciones visuales a ambos métodos.

Tabla IV.22. Ecuaciones logísticas de las curvas dosis respuestas de aminoglucósidos, macrólidos y quinolonas en leche analizadas con Bioensayo “BT”

Antimicrobianos	Logit [P] = $\beta_0 + \beta_1$ [Antimicrobianos]	C
<i>Aminoglucósidos</i>		
Gentamicina	Logit [P] = -6.9030 + 0.0308 [GEN]	98.5
Kanamicina	Logit [P] = -17.2235 + 0.0036 [KAN]	97.6
Neomicina	Logit [P] = -8.0453 + 0.0185 [NEO]	98.8
Estreptomycin	Logit [P] = -15.6155 + 0.0082 [STM]	97.4
<i>Macrólidos</i>		
Eritromicina	Logit [P] = -9.9878 + 0.0616 [ERI]	98.8
Lincomicina	Logit [P] = -5.2339 + 0.0535 [LIN]	98.6
Espiramicina	Logit [P] = -12.042 + 0.0044 [SPI]	98.1
Tilosina	Logit [P] = -6.2931 + 0.1247 [TIL]	95.5
<i>Quinolonas</i>		
Ciprofloxacina	Logit [P] = -19.013 + 0.0125 [CIP]	96.7
Enrofloxacin	Logit [P] = -26.629 + 0.00146 [ENR]	98.8
Marbofloxacina	Logit [P] = -19.2467 + 0.00818 [MAR]	99.7
Norfloxacin	Logit [P] = -11.5749 + 0.00205 [NOR]	95.5

GEN: gentamicina, KAN: kanamicina, NEO: neomicina, STM: estreptomycin, ERI: eritromicina, LIN: lincomicina, SPI: spiramicina, TIL: tilosina, CIP: ciprofloxacina, ENR: enrofloxacin, MAR: marbofloxacina, NOR: norfloxacina, C: Coeficiente de concordancia porcentual.

De todos los antimicrobianos ensayados, gentamicina, neomicina, eritromicina, lincomicina y tilosina presentaron mayores valores de los coeficientes “ β_1 ” que el resto. Este hecho demuestra cierta sensibilidad de *G. stearothermophilus* para estas moléculas, poniendo de manifiesto posibles inconvenientes de especificidad cruzada

en los resultados del SMmp1. Por el contrario, los coeficientes “ β_1 ” de kanamicina, estreptomycin, espiramicina, ciprofloxacina, enrofloxacin, marbofloxacina y norfloxacina fueron bajos en comparación con los demás antibióticos, debido a la baja sensibilidad de *G. stearothermophilus* para detectarlos.

Los ajustes obtenidos mediante el modelo logístico fueron adecuados, puesto que los coeficientes de concordancia están comprendidos en el rango 92.7% (ciprofloxacina, Bioensayo “BS”) y 99.7% (marbofloxacina, Bioensayo “BT”).

Tabla IV.23. Ecuaciones logísticas de las curvas dosis respuestas de aminoglucósidos, macrólidos y quinolonas en leche analizadas con Bioensayo “BS”

Antimicrobianos	Logit [P] = $\beta_0 + \beta_1$ [Antimicrobianos]	C
<i>Aminoglucósidos</i>		
Gentamicina	Logit [P] = -10.8142+0.0258 [GEN]	98.6
Kanamicina	Logit [P] = -20.4766+0.0038 [KAN]	97.7
Neomicina	Logit [P] = -11.0868+0.0117 [NEO]	98.4
Estreptomycin	Logit [P] = -2.7858+0.0016 [EST]	98.2
<i>Macrólidos</i>		
Eritromycin	Logit [P] = -6.5458+0.0499 [ERI]	98.2
Lincomycin	Logit [P] = -3.7942+0.0306 [LIN]	97.9
Espiramicina	Logit [P] = -8.7541+0.00452 [SPI]	98.3
Tilosina	Logit [P] = -11.0323+0.2845 [TIL]	98.2
<i>Quinolonas</i>		
Ciprofloxacina	Logit [P] = -13.4158 +0.00838 [CIP]	92.7
Enrofloxacin	Logit [P] = -32.9224+0.0153 [ENR]	98.5
Marbofloxacina	Logit [P] = -23.9022 +0.00616 [MAR]	98.9
Norfloxacina	Logit [P] = -10.5889+0.00198 [NOR]	94.3

GEN: gentamicina, KAN: kanamicina, NEO: neomicina, STM: estreptomycin, ERI: eritromycin, LIN: lincomycin, SPI: spiramicina, TIL: tilosina, CIP: ciprofloxacina, ENR: enrofloxacin, MAR: marbofloxacina, NOR: norfloxacina, C: Coeficiente de concordancia porcentual.

Figura IV.15 y Figura IV.16 muestran los efectos que producen el incremento de las concentraciones aminoglucósidos sobre las respuestas de Bioensayo “BT” y “BS”, mientras que Figura IV.17 y Figura IV.18 representan las curvas dosis respuestas de los macrólidos para ambos métodos. Por último, los efectos de los niveles de quinolonas en leche sobre las interpretaciones visuales de Bioensayo “BT” y Bioensayo “BS” se exponen en Figura IV.19 y Figura IV.20.

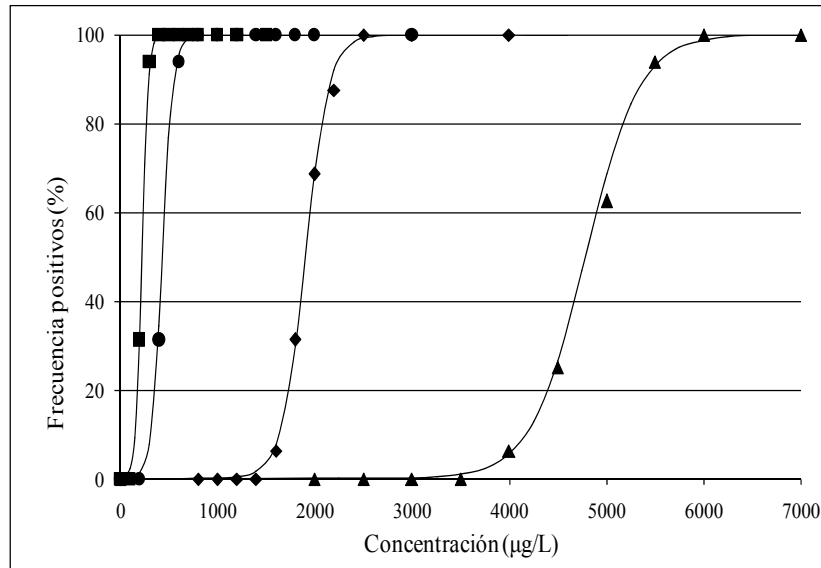


Figura IV.15. Curvas dosis respuestas de aminoglucósidos en leche analizadas con Bioensayo "BT" (■: gentamicina, ▲: kanamicina, ●: neomicina, ◆: estreptomicina).

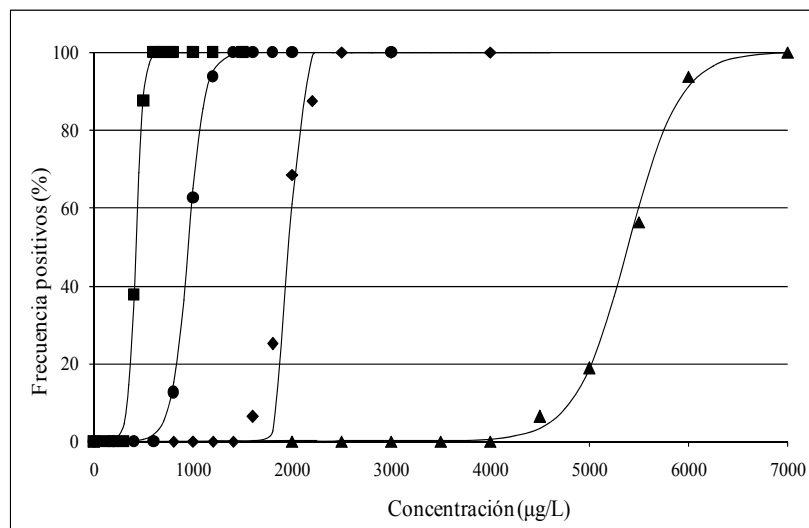


Figura IV.16. Curvas dosis respuestas de aminoglucósidos en leche analizadas con Bioensayo "BS" (■: gentamicina, ▲: kanamicina, ●: neomicina, ◆: estreptomicina).

De los cuatro aminoglucósidos estudiados, gentamicina y neomicina presentan curvas dosis-respuestas que crecen más rápidamente que las curvas de kanamicina y estreptomicina, ya que poseen mayores valores de los términos " β_1 ".

Con respecto a los macrólidos, bajos incrementos en las concentraciones de tilosina (100 µg/l), lincomisina (150 µg/l) y eritromicina (200 µg/l) resultan suficientes para que los indicadores de los medios de cultivo de Bioensayo "BT" y Bioensayo "BS" conserven su coloración inicial.

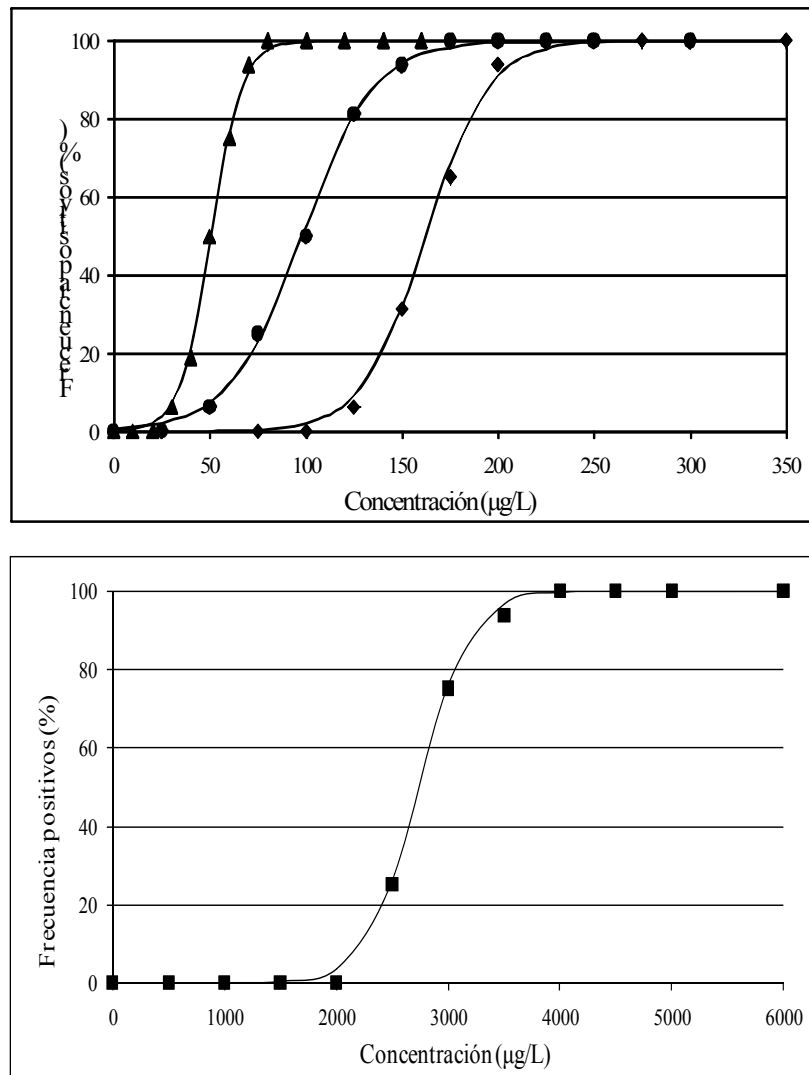


Figura IV.17. Curvas dosis respuestas de macrólidos en leche analizadas con Bioensayo “BT” (▲: tilosina, ◆: eritromicina, ●: lincomicina, ■: espiramicina).

Por el contrario, espiramicina requerirá de mayores concentraciones, comprendidas entre 3000 µg/l (Bioensayo “BS”) y 4000 µg/l (Bioensayo “BT”), para producir un 100% de resultados positivos, debido a los bajos valores de los coeficientes “ β_1 ” (Tabla IV.22 y Tabla IV.23).

Para el caso de las quinolonas (Figura IV.17 y Figura IV.18), ciprofloxacina (1000-1500 µg/l), enrofloxacin (1500-2000 µg/l), marbofloxacina (3500-5000µg/l) y norfloxacina (3000-7500 µg/l) deben estar presentes en la leche a elevadas concentraciones para producir cambios nítidos en las respuestas visuales de los métodos. Por ello, *G. stearotherophilus* no presenta sensibilidad para estos antimicrobianos (bajos coeficientes “ β_1 ”).

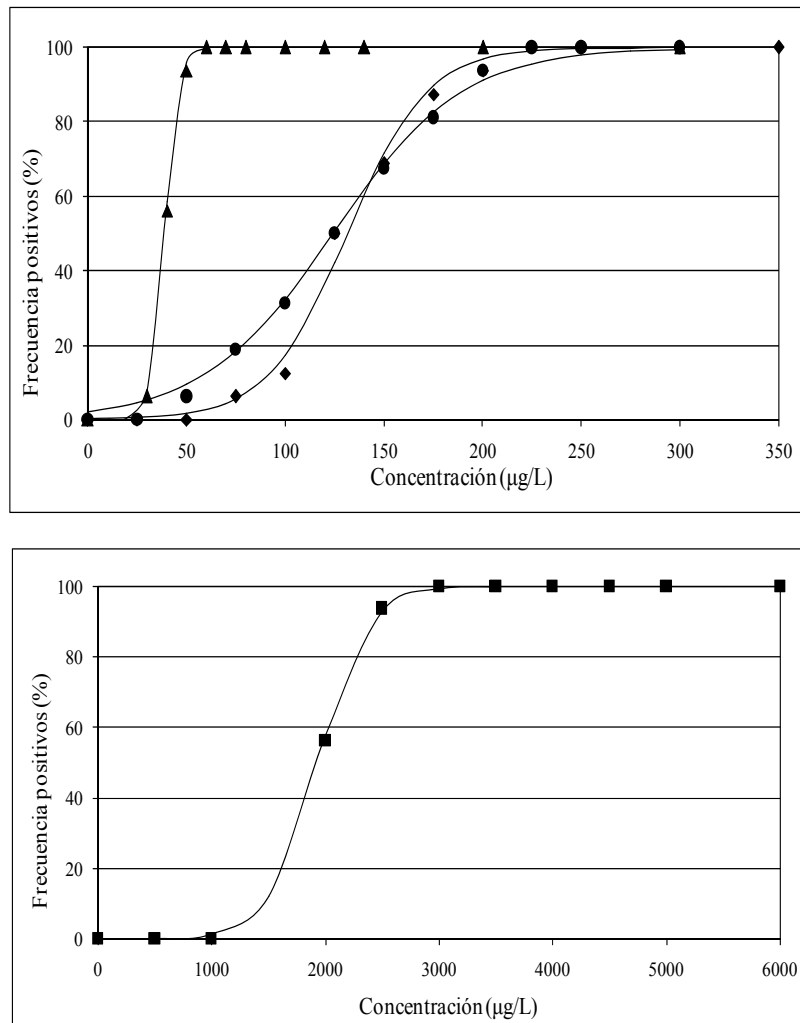


Figura IV.18. Curvas dosis respuestas de macrólidos en leche analizadas con Bioensayo “BS” (▲: tilosina, ◆: eritromicina, ●: lincomicina, ■: espiramicina)

Los límites de detección de aminoglucósidos, macrólidos y quinolonas para el SMmp1 se resumen en la Tabla IV.24 y fueron calculados utilizando las ecuaciones logísticas de Tabla IV.22 y Tabla IV.23.

Con respecto a los aminoglucósidos, se debe mencionar que neomicina se puede detectar por ambos métodos a niveles inferiores a su LMR (1500 µg/l). Los LDs de neomicina se encuentran dentro del rango de 300 a 5000 µg/l establecido para BRT[®] AiM (Analytic in Milch, 1998), pero resultan superiores a las 500 µg/l determinado por Charm y Ruth (1993), aunque se debe destacar que Heeschen (1993) señala niveles más elevados para este aminoglucósido (22000 y 15000 µg/l) cuando emplea el método BRT[®] AiM.

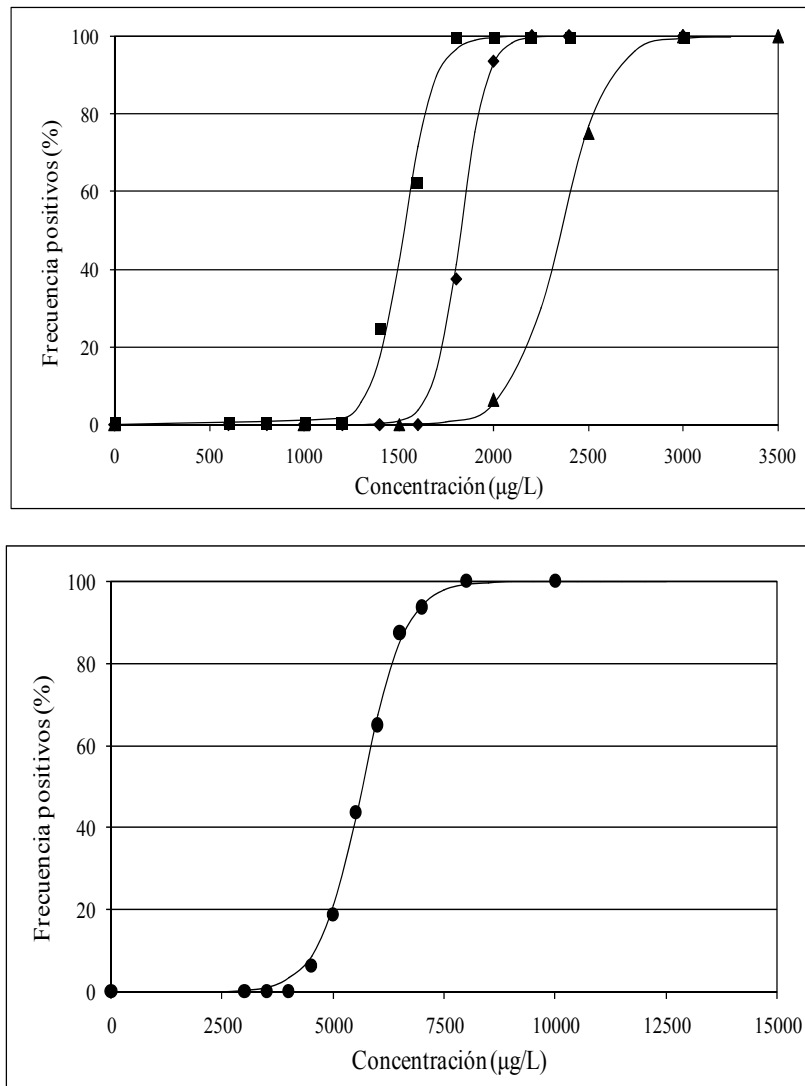


Figura IV.19. Curvas dosis respuestas de quinolonas en leche analizadas con Bioensayo “BT” (■: ciprofloxacina, ◆: enrofloxacina, ▲: marbofloxacina, ●: norfloxacina).

Por su parte, gentamicina presenta límites de detección superiores (320 µg/l para Bioensayo “BT” y 530 µg/l para Bioensayo “BS”) que su LMR (100 µg/l). Aunque se encuentran cercanos a los rangos 400-1000 µg/l señalados por Frank (1995) para el método BRT[®] AiM. Los residuos de estreptomicina deben hallarse en la leche a una concentración superior a 10 veces su LMR (200 µg/l) para poder ser detectados mediante el SMmp1. Los límites de detección (Bioensayo “BT”: 2300 µg/l y Bioensayo “BS”: 3600 µg/l) de este aminoglucósido en leche se hallan dentro del rango 1500-5000 µg/l publicado por Frank (1995) y resultó superior a 1000-2000 µg/l establecido por la casa fabricante BRT[®] AiM (Analytic in Milch, 1998).

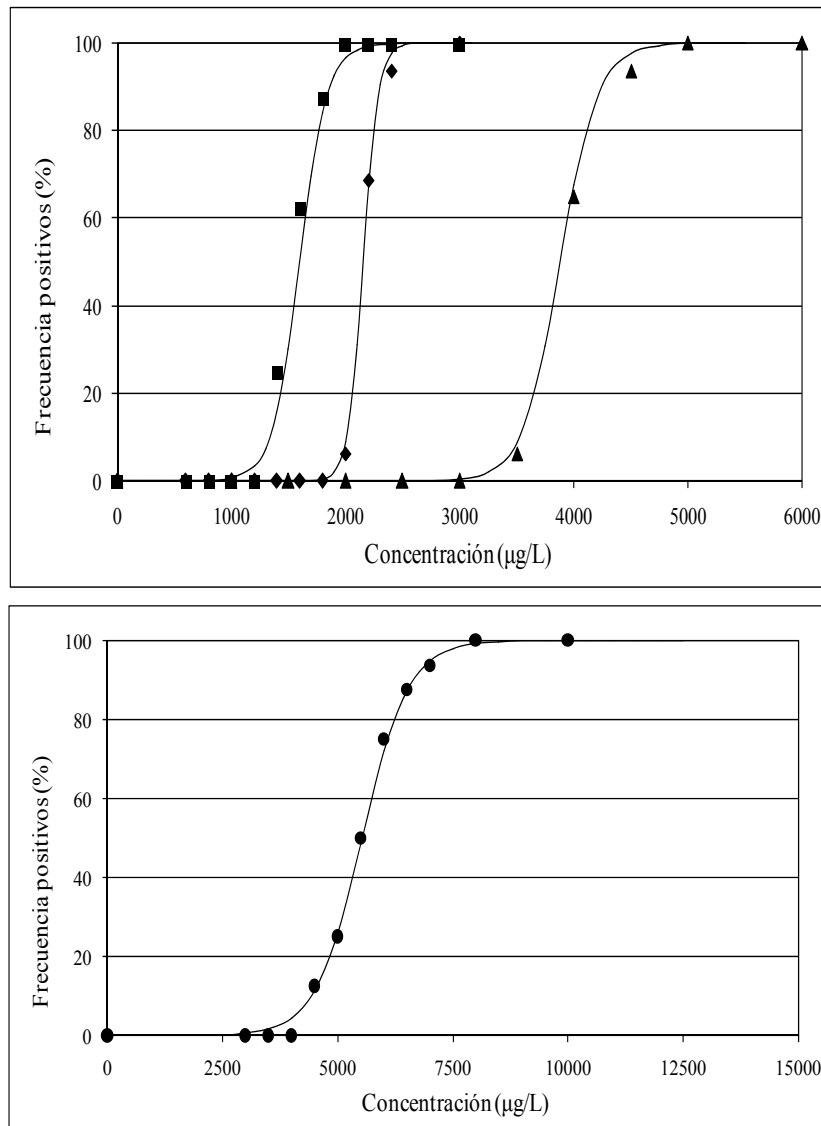


Figura IV.20. Curvas dosis respuestas de quinolonas en leche analizadas con Bioensayo “BS” (■: ciprofloxacin, ◆: enrofloxacin, ▲: marbofloxacin, ●: norfloxacin,).

Para los aminoglucósidos, Molina *et al.* (2003) obtienen LDs más elevados cuando utilizan el método BRT[®] AiM con muestras de leche de oveja (6000 µg/l de estreptomina, 1200 µg/l de gentamicina y 3700 µg/l de neomicina). De igual forma, Althaus *et al.* (2002) detectan 10000 µg/l de estreptomina, 1200 µg/l de gentamicina y 3300 µg/l de neomicina con el método Delvotest[®] SP. Por su parte, Montero *et al.* (2005) al emplear el método Eclipse[®] 100ov detectan niveles elevados de gentamicina (3140 µg/l), kanamicina (18700 µg/l), neomicina (9100 µg/l) y estreptomina (10100 µg/l) en leche de oveja.

Tabla IV.24. Límites de detección de aminoglucósidos, macrólidos y quinolonas en leche para el SMmp1

Otros antimicrobianos	Límites de detección del SMmp1		LMR
	Bioensayo "BT"	Bioensayo "BS"	
<i>Aminoglucósidos</i>			
Gentamicina	320	530	100
Kanamicina	5600	6200	150
Neomicina	600	1200	1500
Estreptomicina	2300	3600	200
<i>Macrólidos</i>			
Eritromicina	210	190	40
Lincomicina	150	220	150
Espiromicina	3400	2600	200
Tilosina	74	50	50
<i>Quinolonas</i>			
Ciprofloxacina	1750	1710	100
Enrofloxacina	2000	2300	100
Marbofloxacina	2700	4400	75
Norfloxacina	7100	5900	-

LD: Límite de detección ($\mu\text{g/l}$), LMR: Límite Máximo de Residuo ($\mu\text{g/l}$).

Linage *et al.* (2007) calculan los siguientes límites de detección mediante la aplicación del modelo de regresión logística: 355-382 $\mu\text{g/l}$ de gentamicina, 915-1084 $\mu\text{g/l}$ de neomicina, 3063-3593 $\mu\text{g/l}$ de estreptomicina para muestras de leche de oveja analizadas por el método Blue-Yellow Test Charm[®], valores similares a los detallados en la Tabla IV.24.

De dichos resultados, se puede concluir que, de los cuatro aminoglucósidos analizados, solamente neomicina puede ser detectado a un nivel semejante a su LMR, Por ello, y a fin de mejorar la sensibilidad para el resto de los aminoglucósidos, Aureli *et al.* (1996) proponen el uso de *B. subtilis* como bacteria-test en cajas de Petri, llegando a detectar 125 $\mu\text{g/l}$ de estreptomicina. Dicho límite disminuye a y 10 $\mu\text{g/l}$ cuando se incorpora cisteína al medio de cultivo.

Con respecto a los macrólidos, según se aprecia en la Tabla IV.24, solamente los residuos de lincomisina (150 $\mu\text{g/l}$ y 220 $\mu\text{g/l}$) y tilosina (74 $\mu\text{g/l}$ y 50 $\mu\text{g/l}$) presentaron límites de detección similares a sus respectivos LMRs (150 $\mu\text{g/l}$ y 50 $\mu\text{g/l}$) establecidos por la legislación.

Los niveles de detección para los residuos de tilosina fueron próximo a las 50 µg/l (Charm y Ruth, 1993), 50-100 µg/l (Frank, 1995) y 58-68 µg/l (Zorraquino, 1997, 1998) determinados para el método BRT[®] AiM.

Los límites de detección de eritromicina en leche (210 µg/l y 190 µg/l) fueron superiores a su LMR (40 µg/l) y resultaron inferiores a las 1000 µg/l, 2250 µg/l y 2500 µg/l calculadas por Charm y Ruth (1993), Heeschen (1993) y Heeschen y Blüthgen (1995), respectivamente.

En leche de oveja, Molina *et al.* (2003) detectan 630 µg/l de eritromicina y 120 µg/l de tilosina empleando el método BRT[®] AiM. Althaus *et al.* (2002) calculan LDs de 980 µg/l de eritromicina y 120 µg/l de tilosina para el método Delvotest[®] SP y Montero *et al.* (2005) obtienen 750 µg/l de eritromicina, 18100 µg/l de espiramicina y 230 µg/l de tilosina para el método Eclipse[®] 100ov. Linage *et al.* (2007) detectan 44-51 µg/l de tilosina, 44-522 µg/l de eritromicina y 1106-1346 µg/l de espiramicina en leche de oveja analizada con el método Blue -Yellow Test Charm[®].

Para los antibióticos pertenecientes a la última familia estudiada (quinolonas), se debe destacar que los límites de detección son muy elevados en comparación con sus LMRs (más de 10 veces superior), no siendo detectados por *G. stearothermophilus*. Por este motivo, algunos autores (Fuselier y Maris, 1999; Gaudin *et al.*, 2001b, Nouws *et al.*, 1999) proponen el uso de *Escherichia coli* ATCC 11303 como bacteria-test para analizar residuos de quinolonas, ya que este microorganismo posee muy buena sensibilidad, llegando a detectar 5 µg/l de enrofloxacin y 8 µg/l de marfloxacin.

Por su parte, Pikkemaat *et al.* (2007) sugieren el uso de *Yersinia ruckeri* NCIMB 13282 en su forma vegetativa (16 a 18 horas a 30°C) para la detección de quinolonas en carne y huevos, logrando detectar 39 µg/l de enrofloxacin, 94 µg/l de flumequine y 23 µg/l de ácido oxolínico.

Okerman *et al.* (2007) llevan a cabo un estudio comparativo para evaluar la detección de residuos de 10 quinolonas en muestras de carne, mediante el empleo de 3 bacterias test (*B. subtilis* BGA, *E. coli* Bayer 14 y *B. cereus*) a dos valores de pH (6.0 y 8.0). Concluyen que *B. cereus* no detecta residuos de quinolonas, mientras que los mejores resultados se obtienen en la placa de *E. coli* a pH=8.0. Resaltan además que *B. subtilis* no detecta quinolonas a niveles cercanos a los LMRs.

Cuando se utilizan otros métodos de screening para la detección de quinolonas, Müller y Jones (1993) también calculan un LD elevado (desde 1000 hasta 2250 µg/l) para residuos de enrofloxacin en leche de vaca cuando emplean el método

BRT[®] AiM. En leche de oveja, Montero *et al.* (2005) utilizan altas concentraciones de ciprofloxacina (5100 µg/l), enrofloxacin (4000 µg/l), flumequine (76200 µg/l) y norfloxacina (9500 µg/l) para ser detectadas por el método Eclipse[®] 100 ov. En forma similar, Linage *et al.* (2007) detectan 41000-46000 µg/l de enrofloxacin en leche de oveja con el método B-Y- Test Charm[®].

IV.1.4.2. Interpretación de los resultados conjuntos de Bioensayos "BT" y "BS"

Con el propósito de resumir los resultados de los límites de detección calculados para Bioensayo "BT" y Bioensayo "BS" (Tabla IV.15, Tabla IV.18, Tabla IV.21 y Tabla IV.24) se confeccionó Tabla IV.25, donde se señalan simplemente aquellos agentes antimicrobianos que pueden (Si) o no (No) ser detectados por el SMmp1 a niveles cercanos a sus LMRs.

El uso simultáneo de ambos métodos permite detectar residuos de antibióticos betalactámicos, neomicina, lincosamina y tilosina, mientras que las sulfamidas son detectadas únicamente por Bioensayo "BS" y las tetraciclinas por Bioensayo "BT".

Dicha información puede simplificarse en la Tabla IV.26. En efecto, el análisis simultáneo de una muestra de leche mediante ambos bioensayos permitirá, en principio, poder identificar la presencia de residuos de antibióticos pertenecientes a tres grandes familias: betalactámicos, tetraciclinas y sulfamidas.

Resultados positivos a ambos bioensayos pondrán de manifiesto la presencia de residuos de betalactámicos en la leche (aunque podría tratarse de neomicina, lincomicina o tilosina), respuestas positivas a Bioensayo "BT" y negativa a Bioensayo "BS" señalan la presencia de residuos de tetraciclinas en la leche, mientras que resultados positivos a Bioensayo "BS" y negativos a Bioensayo "BT" ponen de manifiesto la presencia de sulfamidas. Por el contrario, aquellas muestras que no presentan residuos a niveles detectables por el método, producirán el viraje de color en ambos métodos.

Por otra parte, se debe destacar que el análisis conjunto de ambos bioensayos ocasiona una cierta interferencia con aquellas muestras de leche que presentaron resultados positivos a los dos métodos, ya que otras moléculas diferentes a los betalactámicos, como la neomicina, lincomicina o tilosina, podrían ser identificados en forma incorrecta como betalactámicos por este sistema microbiológico.

Tabla IV.25. Detección simultánea de antimicrobianos en la leche mediante Bioensayos “BT” y “BS”

Antibiótico	Bioensayo “BT”	Bioensayo “BS”
Amoxicilina	Si	Si
Ampicilina	Si	Si
Cloxacilina	Si	Si
Oxacilina	Si	Si
Penicilina “G”	Si	Si
Cefalexina	Si	Si
Cefoperazone	Si	Si
Ceftiofur®	Si	Si
Clortetraciclina	Si	No
Oxitetraciclina	Si	No
Tetraciclina	Si	No
Sulfadiazina	No	Si
Sulfadimetoxina	No	Si
Sulfametazina	No	Si
Sulfametoxazol	No	Si
Sulfatiazol	No	Si
Gentamicina	Si	Si
Kanamicina	No	No
Neomicina	Si	Si
Estreptomina	No	No
Eritromicina	Si	Si
Lincomicina	Si	Si
Espiromicina	No	No
Tilosina	Si	Si
Ciprofloxacina	No	No
Enrofloxacina	No	No
Marbofloxacina	No	No
Norfloxacina	No	No

Este problema puede solucionarse mediante la realización de un tercer análisis en el cual se incorpora la enzima penicilinas. Esta enzima inactiva a las moléculas de antibióticos betalactámicos de la leche y, por lo tanto, el resultado en un Bioensayo

("BT" o "BS") con adición previa de esta enzima permitirá que las muestras de leche que contengan antibióticos betalactámicos no produzcan acción antimicrobiana sobre *G. stearotherophilus*, acompañado de un viraje de color de los indicadores.

Tabla IV.26. Interpretación de los resultados mediante la aplicación simultánea de Bioensayos "BT" y "BS"

Antimicrobianos	Resultado	
	Bioensayo "BT"	Bioensayo "BS"
Betalactámicos	+(*)	+(*)
Tetraciclinas	+	-
Sulfamidas	-	+
Ausencia o no detectable	-	-

(*) Pueden presentarse interferencias debido a neomicina, lincomisina o tilosina.

Por el contrario, si la muestra de leche posee residuos de neomicina, lincomisina o tilosina; la penicilinas no producirá ningún efecto sobre estas moléculas y por consiguiente se manifestará la inhibición del crecimiento de la bacteria-test, perdurando los colores originales de ambos métodos. De este modo, la realización de un tercer análisis microbiológico permitiría clarificar la falta de selectividad debido a las interferencias de estas moléculas.

Por último, es de destacar que, el análisis de muestra de leche con dos bioensayos constituye un instrumento más eficaz en el control de residuos que los métodos microbiológicos utilizados actualmente en los planes de trazabilidad, ya que una muestra de leche que se analiza por dos métodos de microbiológicos en forma simultánea, tendrá menos probabilidades de ocasionar problemas en los procesos fermentativos de las industrias lácteas.

IV.2. DISEÑO Y OPTIMIZACIÓN DEL SISTEMA MICROBIOLÓGICO EN MICROPLACA 2 (SMmp2)

IV.2.1. DISEÑO DEL BIOENSAYO B (*G. stearothermophilus*) PARA LA DETECCIÓN DE BETALACTÁMICOS EN LECHE

Para la detección de betalactámicos en la leche se seleccionó *G. stearothermophilus* como bacteria-test. Sin embargo, las tetraciclinas pueden ser detectadas por este microorganismo a un nivel levemente superior a su LMR. Debido a que estos antibióticos presentan una acción bacteriostática, su acción antimicrobiana se modifica con el tiempo. Haciendo uso de esta propiedad, se llevó a cabo un experimento con el propósito de prolongar el tiempo de incubación del bioensayo para lograr un incremento en los límites de detección de las tetraciclinas, sin perjudicar los niveles de los antibióticos betalactámicos, disminuyendo de este modo los problemas de especificidad cruzada por parte de las tetraciclinas.

Se consideró conveniente emplear Müeller Hinton como medio de cultivo e indicadores redox negro brillante y azul de toluidina, debido a que las tetraciclinas presentan mayores límites de detección que al emplear PCA y púrpura de bromocresol, evitando de esta manera los problemas de especificidad cruzada.

IV.2.1.1. Efecto de concentración de esporas y tiempo de incubación sobre la respuesta de Bioensayo "B" para antibióticos betalactámicos

Tabla IV.27 resume los principales parámetros estadísticos calculados mediante el modelo de regresión logística de segundo orden para el estudio del efecto de concentración de esporas "E" y tiempo de incubación "Ti" del método sobre la respuesta del bioensayo.

Cloxacilina, oxacilina y penicilina "G" presentaron un comportamiento similar, con efectos significativos para "Ti", "Ti²", "Log[E]" y "(Log[E])²", además resultó significativo el efecto de la interacción entre "Ti" y "Log[E]" para ampicilina, cloxacilina y penicilina "G". Con respecto a ampicilina, solamente se observa un efecto lineal y cuadrático para la variable "Log[E]" y su interacción con el "Ti".

Los efectos de "Log[E]" y "Ti" sobre la respuesta del método se observaron en el diseño robusto para la detección de residuos de penicilina "G" en leche mediante *G.*

stearotherophilus (IV.1.1.) con elevados valores de chi cuadrado (χ^2) para esporas ($\chi^2 = 65.0409$) y tiempo de incubación del bioensayo ($\chi^2 = 49.19.45$) según Tabla IV.1.

Tabla IV.27. Parámetros estadísticos calculados mediante el modelo logístico en la optimización de Bioensayo "B" (*G. stearotherophilus*) para la detección de betalactámicos en leche

Betalactámico	Efecto	Valor " χ^2 "	Valor "p"
Ampicilina	Log [E]	10.5379	0.0012
	Tiempo	0.1196	0.7295
	(Log[E]) ²	9.7162	0.0018
	Tiempo ²	0.6574	0.4175
	Tiempo*Log[E]	20.3839	0.0001
Cloxacilina	Log [E]	2.2987	0.1295
	Tiempo	29.0600	0.0001
	(Log[E]) ²	65.3391	0.0001
	Tiempo ²	29.6804	0.0001
	Tiempo*Log[E]	80.6884	0.0001
Oxacilina	Log [E]	13.8721	0.0002
	Tiempo	16.2844	0.0001
	(Log[E]) ²	12.4545	0.0004
	Tiempo ²	11.7939	0.0006
	Tiempo*Log[E]	1.0859	0.2974
Penicilina "G"	Log [E]	7.5161	0.0058
	Tiempo	24.6119	0.0001
	(Log[E]) ²	5.3340	0.0209
	Tiempo ²	5.8266	0.0158
	Tiempo*Log[E]	17.5167	0.0001

Las ecuaciones logísticas que expresan la frecuencia de resultados positivos del bioensayo como una función de las concentraciones de betalactámicos y aquellos factores que afectaron significativamente a su respuesta, se resumen en Tabla IV.28.

Se aprecia en dicha tabla que el tiempo de incubación del bioensayo presentó un efecto lineal negativo en casi todos los casos, a excepción de ampicilina, que resultó negativo la interacción del tiempo con "Log[E]", denotando un corrimiento de las curvas logísticas en la medida que se incrementa el tiempo de incubación. Con

respecto a la influencia de la transformación logarítmica de la concentración de esporas, se observan efectos lineales negativos y cuadráticos positivos para ampicilina, oxacilina y penicilina “G”, mientras que cloxacilina manifestó una interacción positiva entre el “Log[E]” y el “Ti” y un efecto negativo de “(Log[E])²”.

En el diseño robusto de un bioensayo para la detección de residuos de penicilina “G” en leche, también se presentaron efectos negativos para la concentración de esporas y el tiempo de incubación (Ecuación IV.1), similares a los detallados en la Tabla IV.28.

Tabla IV. 28. Modelos logísticos que expresan los efectos de concentración de esporas y tiempo de incubación sobre las curvas dosis-respuesta de betalactámicos en leche analizadas mediante Bioensayo “B” (*G. stearothermophilus*)

Betalactámico	Logit [P _{ijkl}] = β ₀ + β ₁ [Beta] _i + β ₂ Log[E] _j + β ₃ [Ti] _k + β ₂₂ (Log[E]) _{jj} ² + β ₃₃ [Ti] _{kk} ² + β ₂₃ Log[E]*[Ti] _{jk}	C
Ampicilina	Logit [P] = 480.95 + 2.9753*[AMPI] - 145.945*Log[E] + 10.6376*(Log[E]) ² - 0.1767*[Ti]*Log[E]	86.9
Cloxacilina	Logit [P] = 53.5333 + 0.2714*[CLOX] - 37.1164*[Ti] - 2.6520*[Ti] ² - 2.0997*(Log[E]) ² + 8.1965*Log[E]*[Ti]	84.6
Oxacilina	Logit [P] = 661.761 + 0.9586*[OXA] - 19.4712*[Ti] + 2.1966*[Ti] ² - 185.846*Log[E] + 13.3229*(Log[E]) ²	91.4
Penicilina “G”	Logit [P] = 596.615 + 5.7550*[PEN] - 50.3205*[Ti] + 1.6916*[Ti] ² - 151.38*Log[E] + 9.5371*(Log[E]) ² + 5.3961*Log[E]*[Ti]	92.9

C: Coeficiente de concordancia porcentual

Los ajustes alcanzados mediante la aplicación del modelo logístico de segundo orden fueron buenos en los cuatro casos, con coeficientes de concordancia comprendidos entre 84.6 % (cloxacilina) y 92.9 (penicilina “G”).

Haciendo uso de las ecuaciones de la Tabla IV.28 se construyeron Figura IV.21 (Ampicilina), Figura IV.22 (Cloxacilina), Figura IV.23 (Oxacilina) y Figura IV.24 (penicilina “G”), donde se muestran los efectos de “Log[E]” y “Ti” sobre las frecuencias relativas de resultados positivos a Bioensayo “B”.

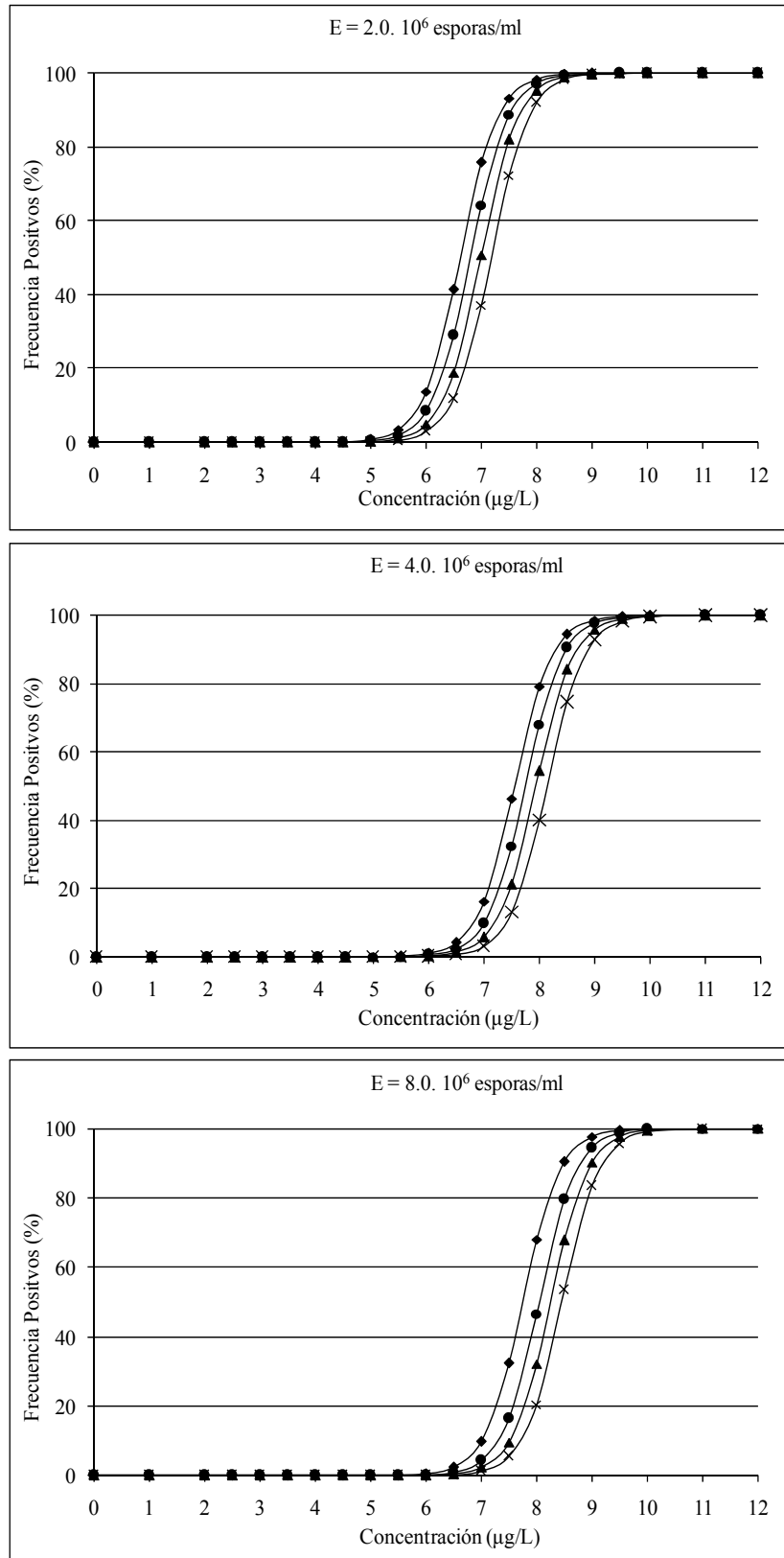


Figura IV.21. Efectos de concentración de esporas y tiempo de incubación sobre la curva dosis-respuesta de ampicilina en leche analizada mediante Bioensayo "B" (*G. stearotherophilus*) (■: T = 3.0 h; ●: 3.5 h; ▲: 4.0 h; x: 4.5 h).

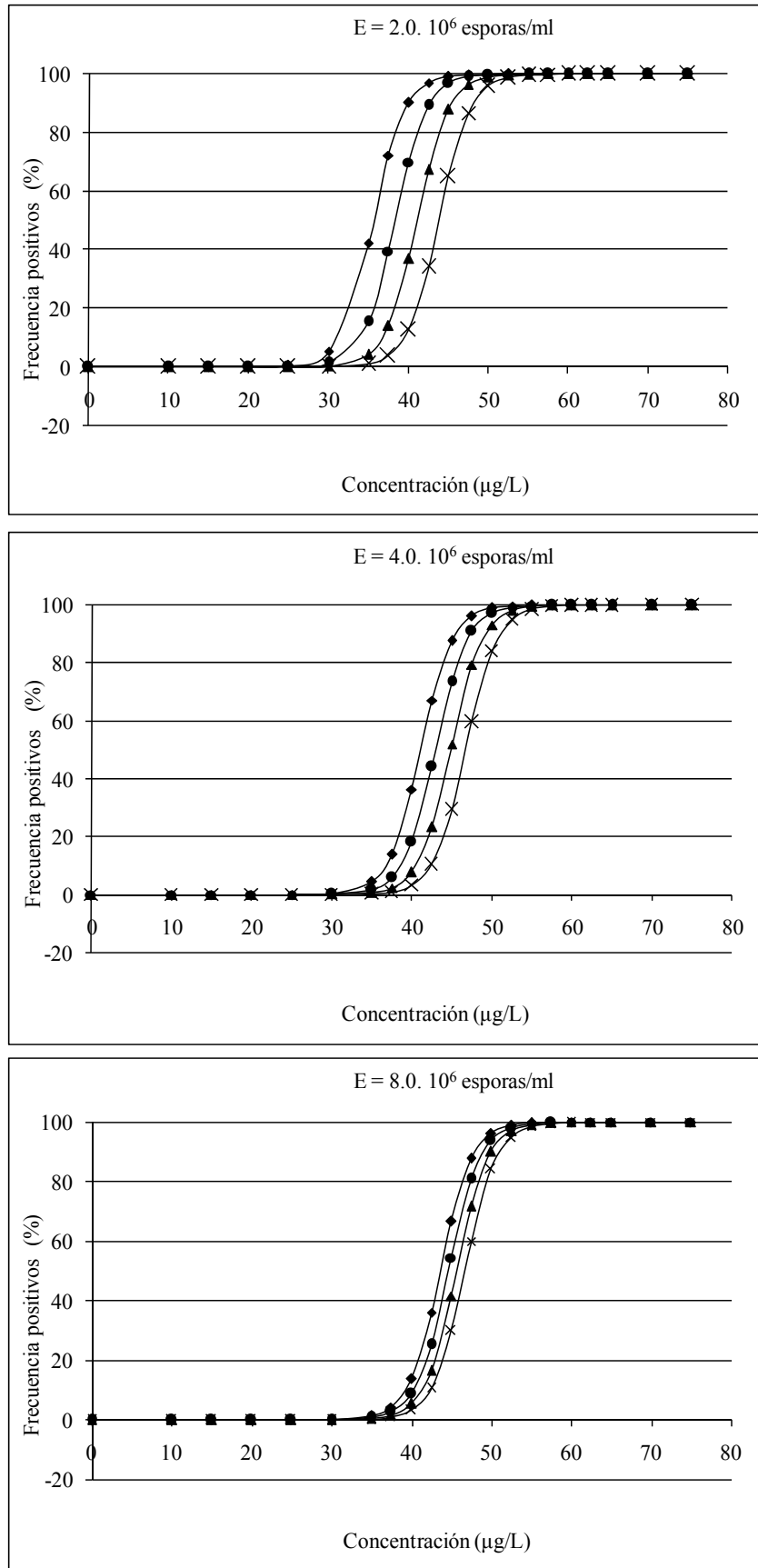


Figura IV.22. Efectos de concentración de esporas y tiempo de incubación sobre la curva dosis-respuesta de cloxacilina en leche analizada mediante Bioensayo "B" (*G. stearothermophilus*) (■: T = 3.0 h; ●: 3.5 h; ▲: 4.0 h; x : 4.5 h).

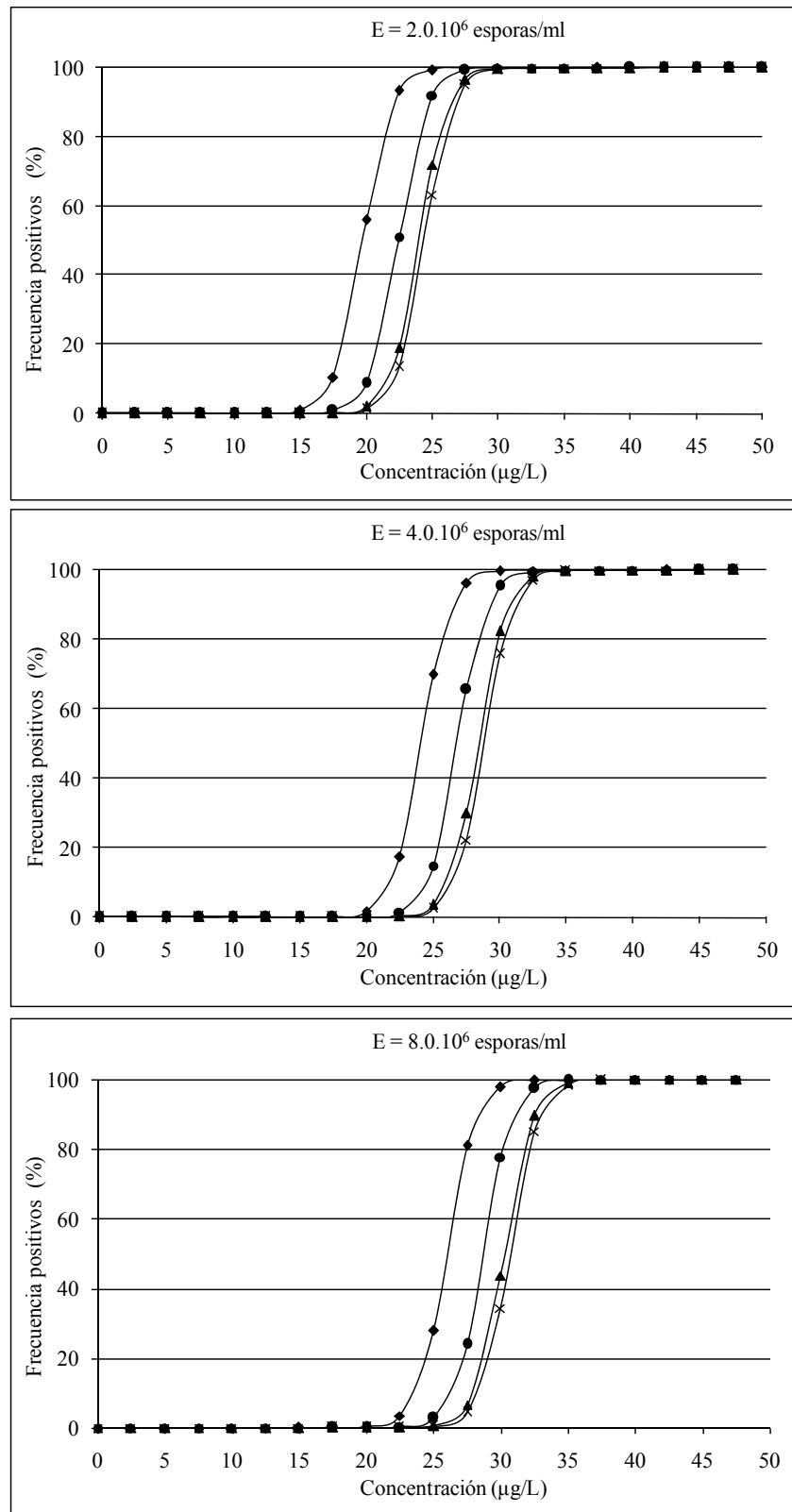


Figura IV.23. Efectos de concentración de esporas y tiempo de incubación sobre la curva dosis-respuesta de oxacilina en leche analizada mediante Bioensayo "B" (*G. stearothermophilus*) (■: T = 3.0 h; ●: 3.5 h; ▲: 4.0 h; x: 4.5 h).

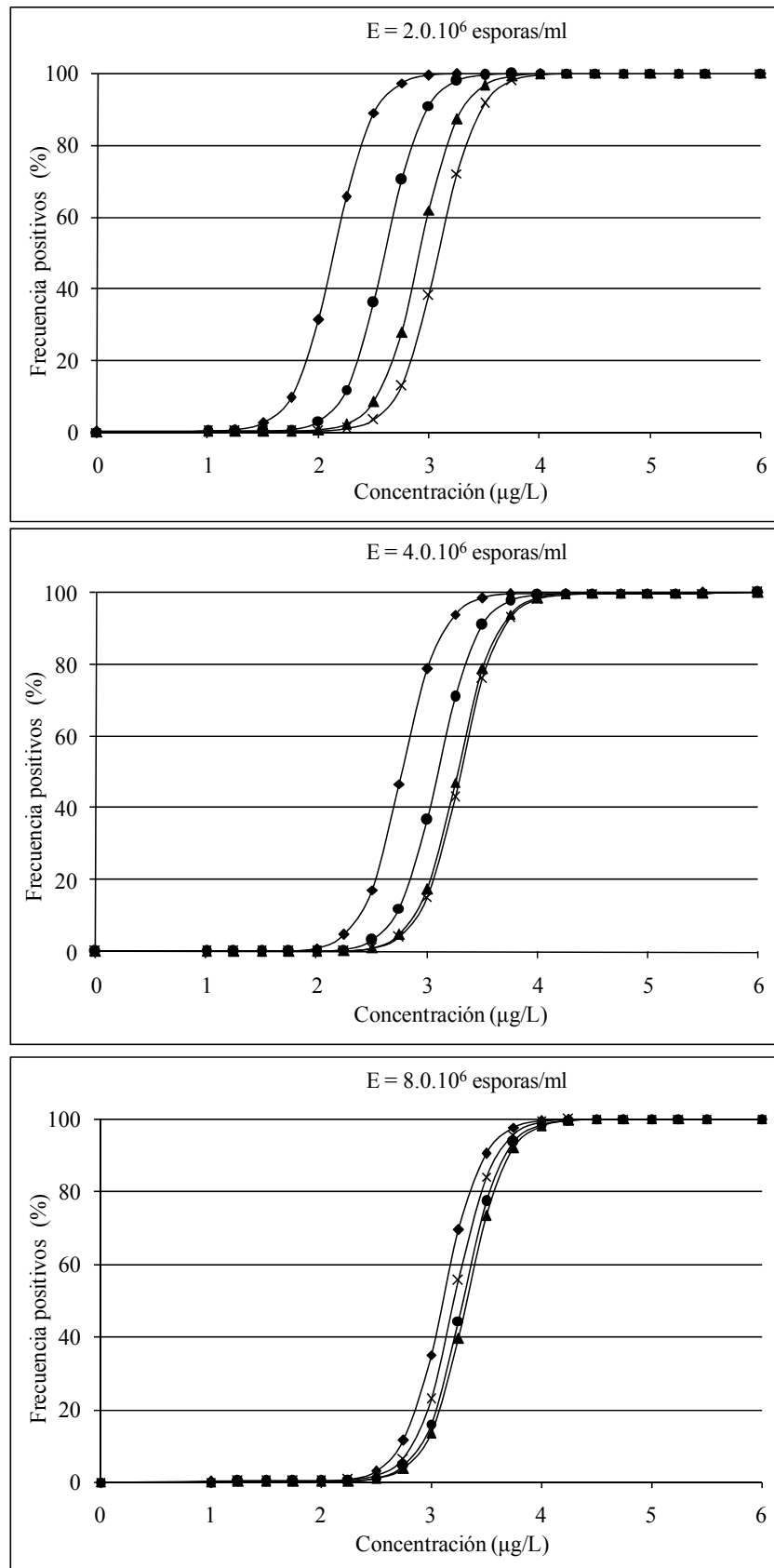


Figura IV.22. Efectos de concentración de esporas y tiempo de incubación sobre la curva dosis-respuesta de penicilina “G” en leche analizada mediante Bioensayo “B” (*G. stearothermophilus*) (■: T = 3.0 h; ●: 3.5 h; ▲: 4.0 h; x: 4.5 h).

Para las cuatro penicilinas ensayadas, las curvas dosis-respuestas se desplazan hacia la derecha (es decir, hacia mayores valores de concentración) conforme se prolonga "Ti". Este hecho se debe a que, niveles de antibióticos levemente inferiores a los LDs de cada fármaco ralentizan el crecimiento del microorganismo de prueba presente en el método, acompañado de una demora en la desaparición del color negro y el acuso de resultados negativos.

También se puede observar en los cuatro casos que, las curvas dosis-respuestas se hallan prácticamente superpuestas cuando las lecturas de las microplacas se efectúan entre las 4.0 y 4.5 h de su incubación. Este efecto se visualiza para cualquiera de los tres niveles de esporas ensayados.

Para cloxacilina (Figura IV.22), oxacilina (Figura IV.23) y penicilina "G" (Figura IV.24) se aprecia que las curvas dosis-respuestas están más próximas para diferentes tiempos de lecturas cuando los bioensayos se elaboran con un mayor nivel de esporas, mostrando una mayor estabilidad en su respuesta conforme se prolonga "Ti".

La Figura IV.25 representa las superficies de respuestas de los límites de detección (calculados como las concentraciones que producen el 95% de resultados positivos al bioensayo) en función de "Log[E]" y "Ti".

Se visualiza un comportamiento similar para las cuatro penicilinas, ya que, una prolongación en "Log[E]" y "Ti" producen un aumento en los límites de detección de ellas. Además, para elevadas concentraciones de esporas, dichos límites se estabilizan a tiempos comprendidos entre las 4.0 y 4.5 horas, debido al efecto cuadrático de "Log[E]". Este hecho señala una mayor robustez de la respuesta del método cuando se trabaja con elevadas concentraciones de esporas.

El incremento en los LDs de la penicilina conforme aumenta "Log[E]" y los "Ti" se observa en el diseño robusto utilizado durante la optimización del bioensayo para la detección de penicilina "G" en leche (Tabla IV.2). Sin embargo, estos LDs no coinciden con los calculados en dicho experimento, ya que se trata de dos bioensayos que utilizan diferentes medios de cultivos, valores de pH e indicadores. Por ello, se puede comparar únicamente las tendencias, pero no los valores absolutos de los LDs.

A modo de síntesis, la Tabla IV.29 resume los LDs calculados para diferentes condiciones del Bioensayo "B". Acorde a lo observado en las figuras anteriores, en esta tabla se evidencia que los LDs de las penicilinas se incrementan en la medida que aumenta "Log[E]" y "Ti". Además, para una concentración de esporas constante, los LDs de las cuatro penicilinas resultan muy similares cuando las lecturas se efectúan a las 4.0 o 4.5 horas de incubación.

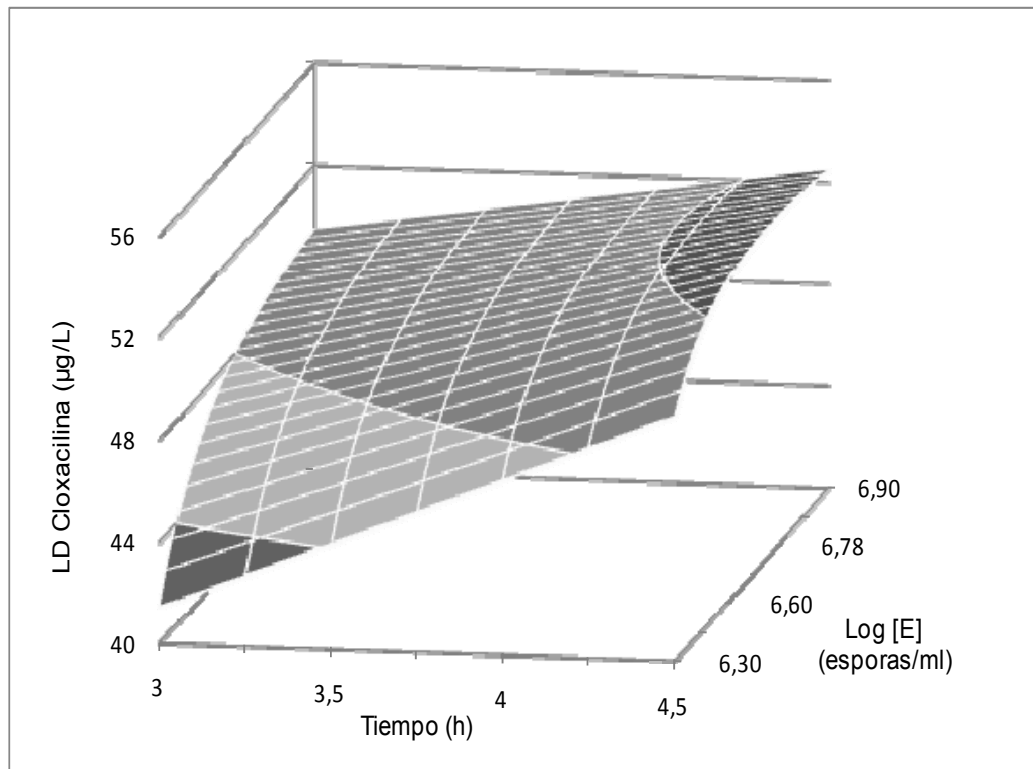
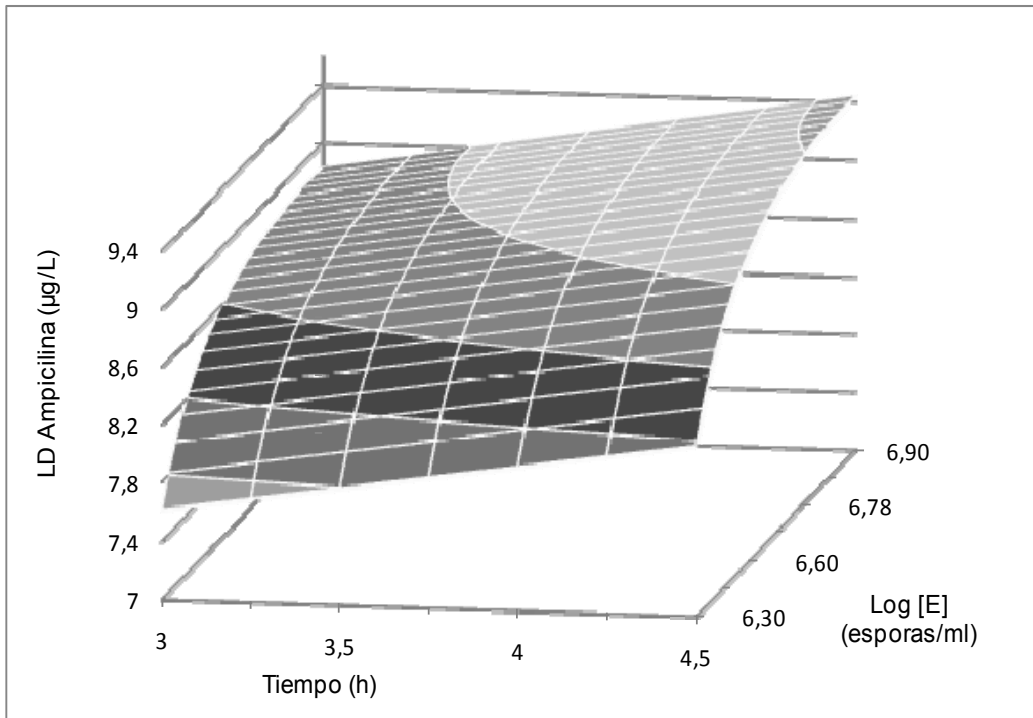


Figura IV.25. Superficies de respuestas que muestran los efectos de la concentración de esporas y tiempo de incubación sobre los límites de detección de Bioensayo "B" (*G. stearothermophilus*).

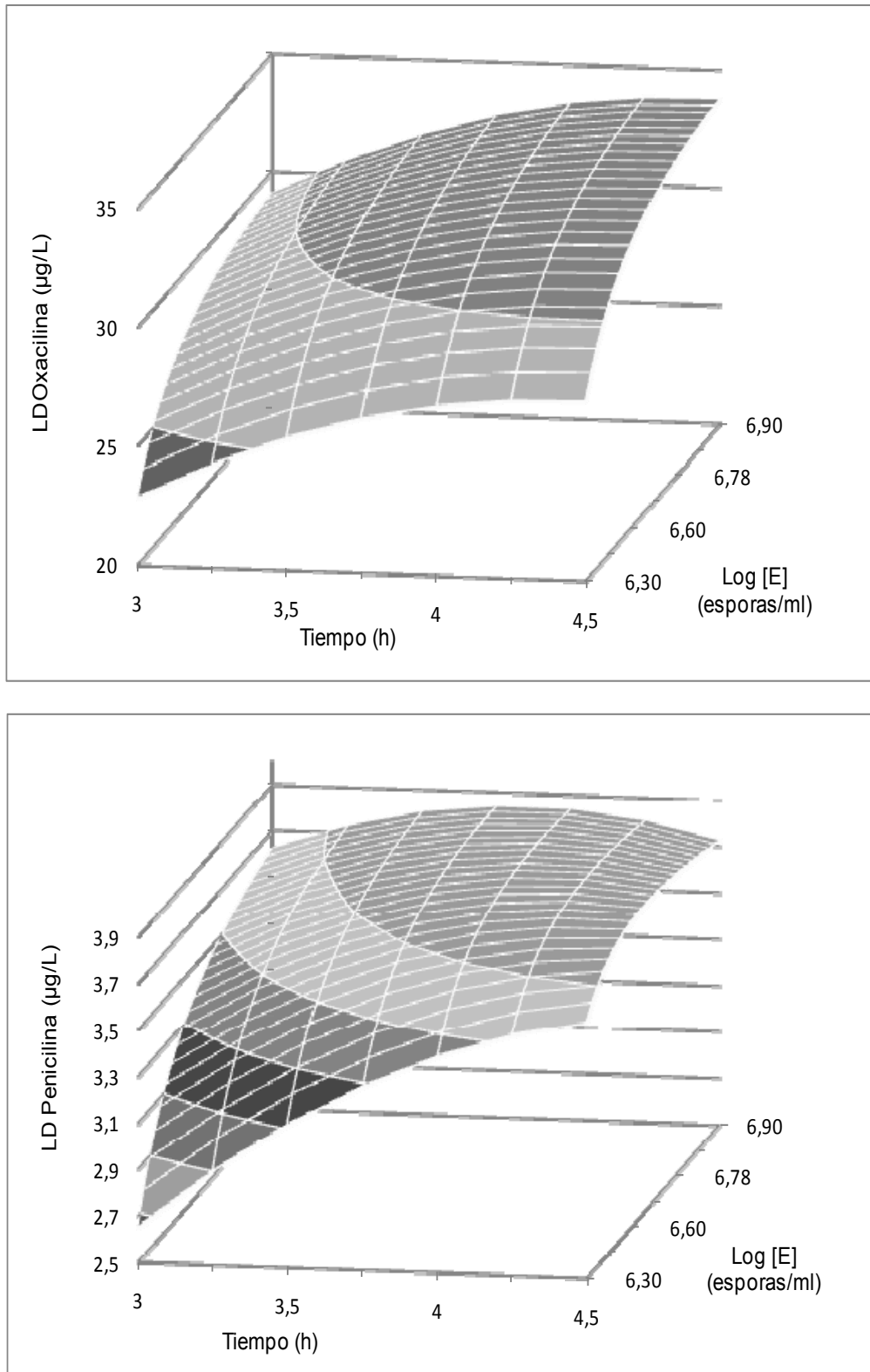


Figura IV.25 (cont.). Superficies de respuestas que muestran los efectos de la concentración de esporas y tiempo de incubación sobre los límites de detección de Bioensayo "B" (*G. stearothersophilus*).

En la última columna de la Tabla IV.29 se calculó la variación relativa porcentual de los LDs obtenidos a las 3.0 y 4.5 horas, para cada nivel de "E". Dichas variaciones son bajas, al estar comprendidas entre 2.9% ("Log[E]"=6.90) y 35.8% ("Log [E]"=6.30) para la penicilina. Además, estas variaciones son más pequeñas cuando se incrementa la concentración de esporas. En efecto, un mayor nivel de esporas presente en el medio de cultivo mostrará una mayor capacidad para amortiguar pequeños cambios en las concentraciones de antibióticos, revelando una mayor robustez por parte del bioensayo.

Tabla IV.29. Efectos de la concentración de esporas y tiempo de incubación sobre los límites de detección ($\mu\text{g/l}$) de penicilinas en leche mediante Bioensayo "B" (*G. stearothermophilus*)

Penicilinas	Log[E] (esporas/ml)	Tiempo incubación (hora)				Variación Relativa
		3.0	3.5	4.0	4.5	
Ampicilina	6.30	7.6	7.8	8.0	8.2	7.4
	6.60	8.5	8.7	8.9	9.1	6.9
	6.90	8.8	9.0	9.2	9.3	6.9
Cloxacilina	6.30	41.4	44.1	46.9	49.6	19.7
	6.60	46.9	48.8	50.7	52.5	12.0
	6.90	49.4	50.5	51.5	52.5	6.2
Oxacilina	6.30	22.8	25.5	27.1	27.5	20.6
	6.60	27.2	29.9	31.5	31.9	17.2
	6.90	29.1	31.8	33.3	33.8	16.1
Penicilina "G"	6.30	2.6	3.1	3.4	3.6	35.8
	6.60	3.3	3.6	3.8	3.8	16.0
	6.90	3.6	3.8	3.8	3.8	2.9

En este sentido, resulta conveniente emplear niveles más elevados de esporas antes que bajas concentraciones, aunque se debe tener en consideración que, el incremento en los niveles de esporas produce un alejamiento de los LDs de las penicilinas en comparación con los Límites Máximos de Residuos ($\text{LMR}_{\text{Amp}} = 4 \mu\text{g/l}$, $\text{LMR}_{\text{Clox}} = 30 \mu\text{g/l}$, $\text{LMR}_{\text{Oxa}} = 30 \mu\text{g/l}$, $\text{LMR}_{\text{PenG}} = 4 \mu\text{g/l}$). Estas diferencias son más importantes para ampicilina y cloxacilina. Este hecho se observó en el diseño robusto de la penicilina "G", ya que una mayor concentración de esporas produce menor variabilidad en los LDs del método.

Por todo ello, deberá evaluarse en detalles la conveniencia de incrementar la concentración de esporas y los tiempos de incubación frente a la pérdida de sensibilidad del bioensayo, a expensas de mantener una respuesta más estable. Dicho estudio debe realizarse interpretando conjuntamente los resultados observados en las penicilinas con los que muestran las tetraciclinas. Para ello, resulta conveniente el uso de la función deseabilidad de modo tal de minimizar los LDs de los betalactámicos y maximizar las respuestas de las tetraciclinas.

Con respecto a otros bioensayos comerciales, para el método BRT[®] AiM, que utiliza Müller Hinton como medio de cultivo y el mismo indicador (Negro Brillante), Jaskch (1988), Charm y Ruth (1993), Heeschen, (1993), Heeschen y Blüthgen (1995) y Zorraquino (1997) calculan límites similares a los detallados en la Tabla IV.29 para ampicilina (5-10 µg/l) y cloxacilina (40-60 µg/l), pero señalan límites inferiores para la penicilina "G" (1 a 3 µg/l).

IV.2.1.2. Efecto de concentración de esporas y tiempo de incubación sobre la respuesta de Bioensayo "B" para tetraciclinas

Entre las numerosas propiedades y requisitos que debe reunir un bioensayo, se destaca la especificidad cruzada. Este apartado persigue como objetivo primordial, disminuir la sensibilidad en la detección de otros antibióticos (como por ejemplo las TCs) diferentes a las penicilinas, para el cual se pretende que el bioensayo resulte específico. Para ello, se considera que un método es inespecífico cuando los LDs de aquellas moléculas para el cual el bioensayo no fue diseñado, son detectadas en una concentración superior a 8-10 veces su LMR.

Tabla IV.30 resume los principales parámetros estadísticos calculados mediante la aplicación del modelo logístico de segundo orden para el estudio de los efectos de "Log[E]" y "Ti" sobre las curvas dosis respuesta de las TCs analizadas con Bioensayo "B".

Se observa que, resultaron significativos los efectos cuadráticos de "Ti" (aunque para TC presentó un valor de $p=0.0788$) y la interacción entre "Log[E]" y "Ti". Además, para CTC y OTC resultó significativo el efecto cuadrático de "Log[E]".

Tabla. IV.31 presenta las ecuaciones logísticas que señalan las variaciones de las curvas dosis respuestas de las TCs en términos de las variables que afectaron en forma significativa a la respuesta de Bioensayo "B".

Tabla IV.30. Parámetros estadísticos calculados mediante el modelo logístico en la optimización de Bioensayo “B” (*G. stearothermophilus*) aplicado al análisis de tetraciclinas en leche

Tetraciclinas	Efecto	Valor “ χ^2 ”	Valor “p”
Clortetraciclina	Log [E]	54.5901	0.0001
	Tiempo	35.1593	0.0001
	(Log[E]) ²	50.3648	0.0001
	Tiempo ²	1.2609	0.2615
	Tiempo*Log[E]	46.5761	0.0001
Oxitetraciclina	Log [E]	10.7233	0.0011
	Tiempo	0.3168	0.5735
	(Log[E]) ²	11.0266	0.0009
	Tiempo ²	5.4618	0.0194
	Tiempo*Log[E]	21.184	0.0001
Tetraciclina	Log [E]	0.5281	0.4674
	Tiempo	33.0956	0.0001
	(Log[E]) ²	0.4485	0.5030
	Tiempo ²	3.0906	0.0788
	Tiempo*Log[E]	115.406	0.0001

Tabla IV. 31. Ecuaciones de las curvas dosis-respuesta de tetraciclinas en leche analizadas mediante el Bioensayo “B” (*G. stearothermophilus*)

Tetraciclinas	$\text{Logit } [P_{ijkl}] = \beta_0 + \beta_1 [TCs]_i + \beta_2 \text{Log}[E]_j + \beta_3 [Ti]_k$ $+ \beta_{22} (\text{Log}[E])^2_{jj} + \beta_{33} [Ti]_{kk}^2 + \beta_{23} \text{Log}[E]*[Ti]_{jk}$	C
Clortetraciclina	$\text{Logit } [P] = -1194.67 + 0.002837*[CLOR] + 45.6482*[Ti] +$ $346.634*\text{Log}[E] - 24.6902*(\text{Log}[E])^2 - 8.043*T*\text{Log}[E]*[Ti]$	88.9
Oxitetraciclina	$\text{Logit } [P] = 521.09 + 0.0100*[OXI] + 1.1519*[Ti]^2 -$ $148.968*\text{Log}[E] + 11.4337*(\text{Log}[E])^2 - 2.6142*\text{Log}[E]*[Ti]$	89.7
Tetraciclina	$\text{Logit } [P] = 14.8872 + 0.0121*[TC] + 6.8904*[Ti] -$ $2.0282*[Ti]*\text{Log}[E]$	91.0

C: Coeficiente de concordancia porcentual.

Los ajustes logrados mediante la aplicación del modelo logístico fueron buenos y se hallan comprendidos entre 88.9% para CTC y 91.0% para TC. En todos los casos, la prolongación de “Ti” del método produce un desplazamiento de la curva dosis

respuesta hacia la derecha, es decir, hacia concentraciones más elevadas de TCS (coeficientes positivos de β_3 o β_{33}).

Para visualizar los efectos de la concentración de esporas y el tiempo de incubación sobre las frecuencias de resultados positivos de Bioensayo "B", se construyeron Figura IV.26 (CTC), Figura IV.27 (OTC) y Figura IV.28 (TC).

En ellas se evidencia el corrimiento de las curvas logísticas en la medida que se incrementa "Ti", también se puede apreciar un desplazamiento en el mismo sentido cuando aumenta la concentración de esporas en el medio de cultivo.

A diferencia de las penicilinas, las curvas dosis-respuestas obtenidas a tiempos de lecturas comprendidos entre las 4.0 y 4.5 horas, no están superpuestas, puesto que se separan como consecuencia de la prolongación del tiempo de incubación.

La Figura IV.29 muestra la superficie de respuesta de los LDs de las tres tetraciclinas para Bioensayo "B", que se construyeron a partir de las ecuaciones de la Tabla IV.21 y el criterio propuesto por IDF (IDF-FIL, 2002). Las superficies de respuestas revelan un incremento continuo de los LDs con ambas variables, sin llegar a estabilizarse como sucedió en el caso de las penicilinas.

Esta discrepancia en el comportamiento de ambas familias de antimicrobianos se puede atribuir a las diferentes formas de acción de las TCs (bacteriostáticos) y las penicilinas (bactericidas). Sin embargo, se puede inferir la importancia de prolongar "Ti" del método y "Log[E]" para evitar problemas de especificidad cruzada.

La Tabla IV.32 resume los LDs calculados para las tres tetraciclinas. Tanto el incremento de "Log[E]", como de "Ti" del Bioensayo "B" causan un aumento en los LDs de las TCs en la leche. Estos incrementos son más acentuados que los observados en la Tabla IV.29 para las penicilinas.

En la última columna de dicha tabla se muestran las variaciones relativas porcentuales de los LDs calculados a las 3.0 y 4.5 horas. Dichas variaciones resultaron mayores a las observadas para las penicilinas. Los incrementos en los LDs para las tres TCs alcanzan valores comprendidos entre 85% (clortetraciclina para "Log[E]" =6.3) y 210% (oxitetraciclina para "Log[E]" =6.3), motivo por el cual se justifica prolongar el tiempo de incubación del método para evitar interferencias con las tetraciclinas.

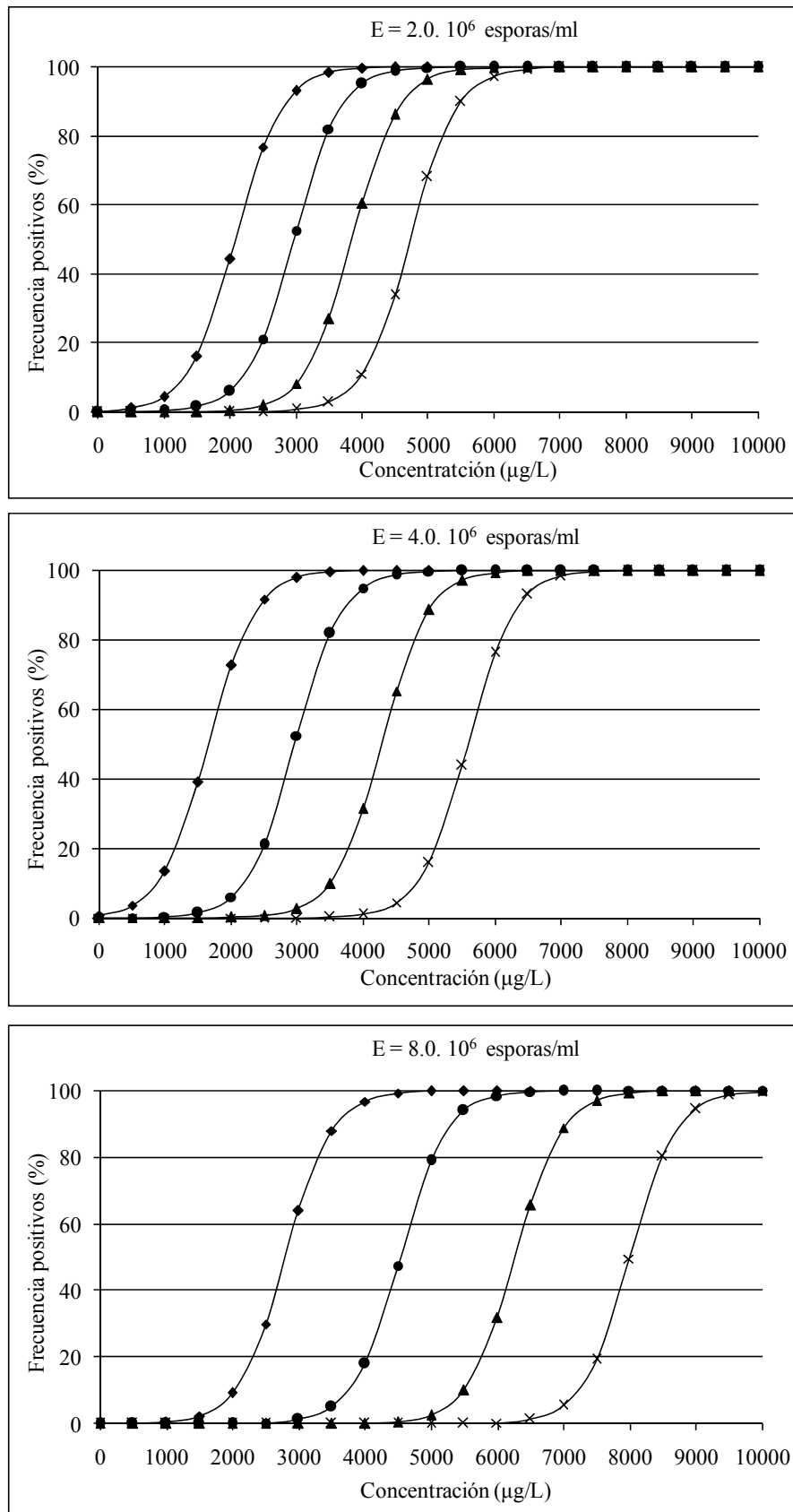


Figura IV.26. Efectos de la concentración de esporas y tiempo de incubación sobre la curva dosis-respuesta de clortetraciclina en leche analizada mediante Bioensayo "B" (*G. stearotherophilus*) (■: T = 3.0 h; ●: 3.5 h; ▲: 4.0 h; x: 4.5 h).

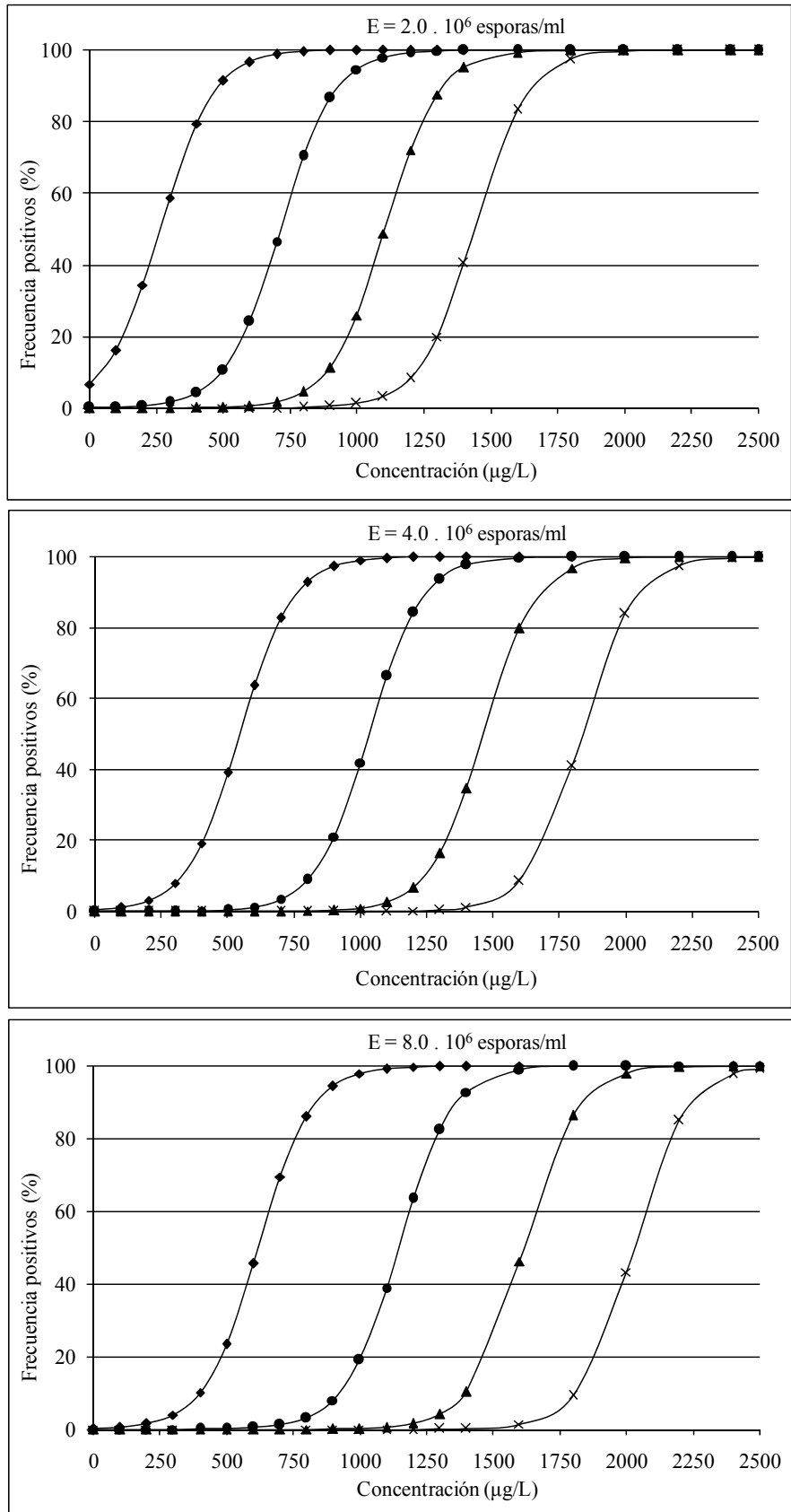


Figura IV.27. Efectos de la concentración de esporas y tiempo de incubación sobre la curva dosis-respuesta de oxitetraciclina en leche analizada mediante Bioensayo "B" (*G. stearothermophilus*) (■: T = 3.0 h; ●: 3.5 h; ▲: 4.0 h; x: 4.5 h).

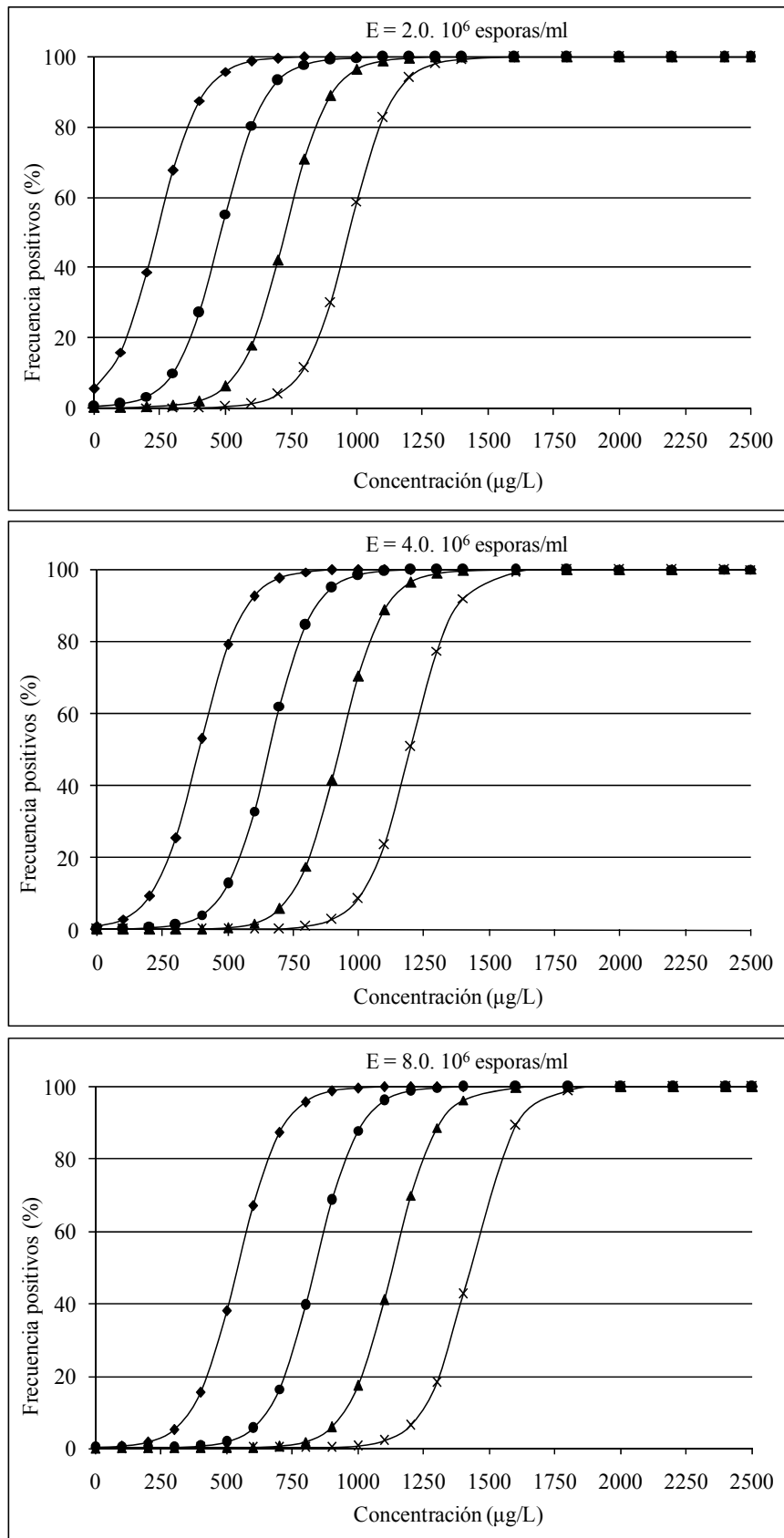


Figura IV.28. Efectos de la concentración de esporas y tiempo de incubación sobre la curva dosis-respuesta de tetraciclina en leche analizada mediante Bioensayo "B" (*G. stearothermophilus*) (■: T = 3.0 h; ●: 3.5 h; ▲: 4.0 h; x: 4.5 h).

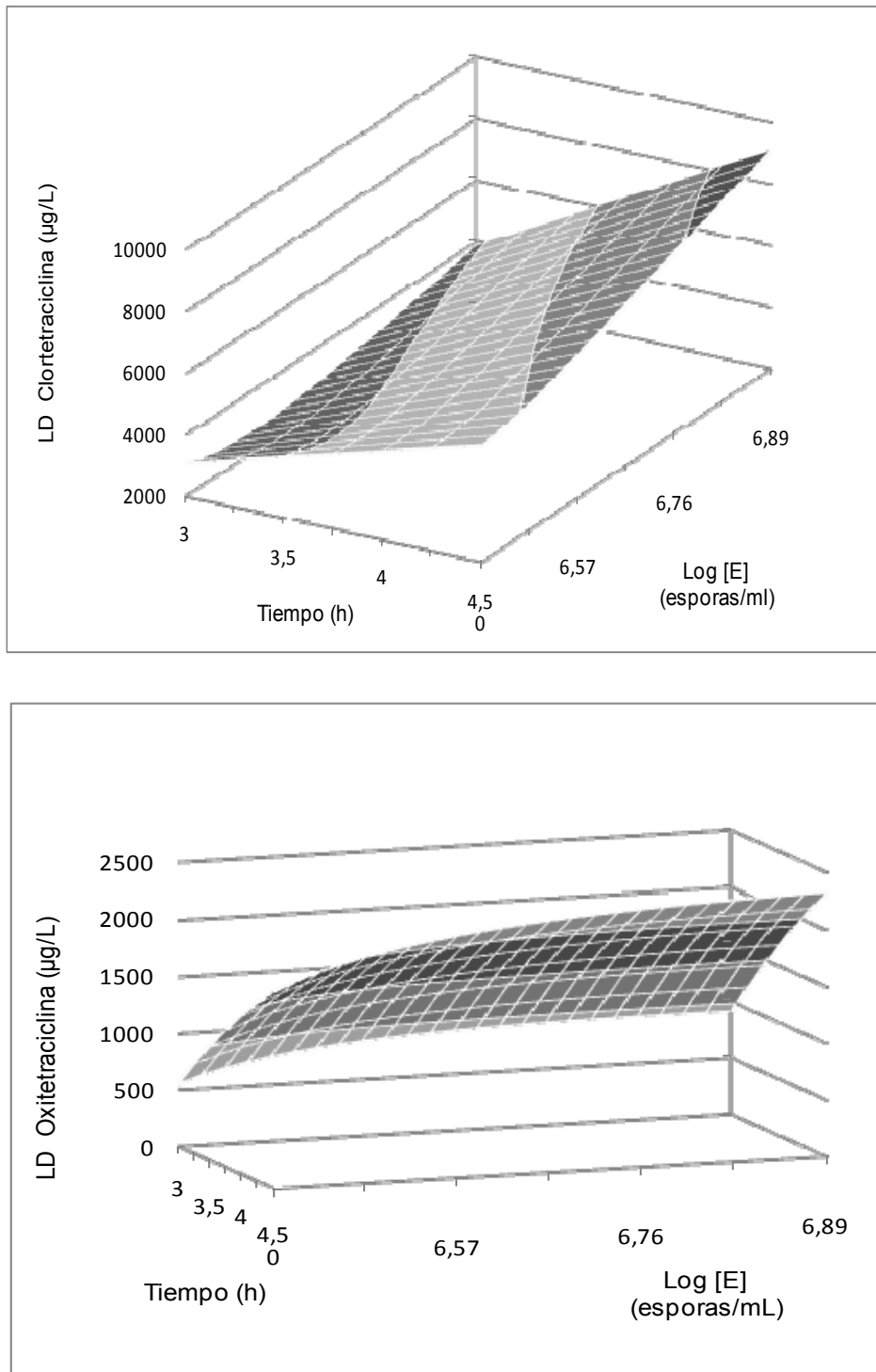


Figura IV.29. Superficies de respuestas que muestran los efectos de la concentración de esporas y tiempo de incubación sobre los límites de detección de tetraciclinas de Bioensayo "B" (*G. stearothermophilus*).

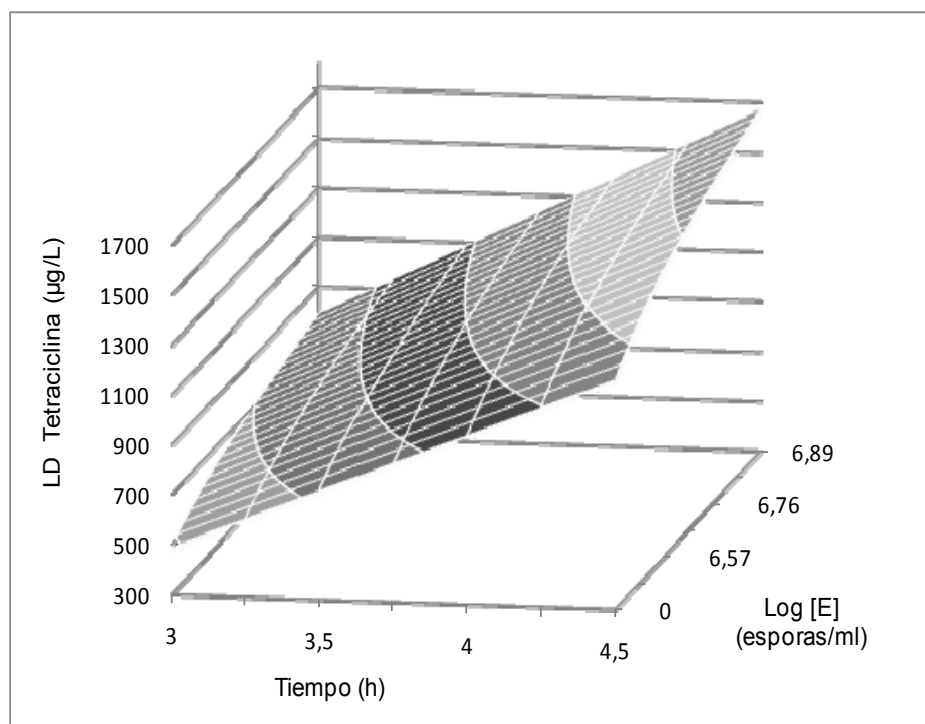


Figura IV.29 (cont.). Superficies de respuestas que muestran los efectos de la concentración de esporas y tiempo de incubación sobre los límites de detección de tetraciclinas de Bioensayo "B" (*G. stearothermophilus*).

Tabla IV.32. Efectos de la concentración de esporas y tiempo de incubación sobre los límites de detección ($\mu\text{g/l}$) de tetraciclinas en leche mediante Bioensayo "B" (*G. stearothermophilus*)

Tetraciclina	Log [E] (esporas/ml)	Tiempo Incubación (hora)				Variación Relativa
		3.0	3.5	4.0	4.5	
Clortetraciclina	6.30	3117	4002	4887	5772	85
	6.60	2694	4004	5315	6625	146
	6.90	3837	5573	7309	9044	136
Oxitetraciclina	6.30	559	1008	1400	1733	210
	6.60	839	1327	1757	2130	154
	6.90	912	1440	1909	2322	155
Tetraciclina	6.30	482	727	971	1215	152
	6.60	634	903	1173	1442	127
	6.90	785	1080	1374	1669	113

Así por ejemplo, cuando se elaboran microplacas con elevadas concentraciones de esporas ($\text{Log}[E] = 6.9$), el bioensayo es robusto en el tiempo para

la detección de penicilinas, mientras que los LDs de las tetraciclinas se alejan en la medida que se prolonga dicho tiempo desde 3.0 horas ($LD_{CTC} = 3837 \mu\text{g/l}$, $LD_{OTC} = 912 \mu\text{g/l}$, $LD_{TC} = 785 \mu\text{g/l}$) hasta las 4.5 horas ($LD_{CTC} = 9044 \mu\text{g/l}$, $LD_{OTC} = 2322 \mu\text{g/l}$, $LD_{TC} = 1669 \mu\text{g/l}$). De este modo, mediante una simple prolongación en el tiempo de lectura se logran LDs superiores a 10 veces el LMR ($100 \mu\text{g/L}$).

A modo de síntesis se puede establecer que el incremento de “Log[E]” y “Ti” alejan los LDs de las TCs para Bioensayo “B”, disminuyendo la especificidad cruzada hacia las TCs y manteniendo una buena especificidad para los antibióticos betalactámicos.

Con respecto a otros bioensayos que emplean Müller Hinton como medio de cultivo e indicador negro brillante, Frank (1995) y Zorraquino (1998) reportan para tetraciclina y oxitetraciclina, límites de detección $2000 \mu\text{g/l}$ y $1500 \mu\text{g/l}$, respectivamente, mientras que para la clortetraciclina, Zorraquino (1998) señala un rango de $3200\text{-}3500 \mu\text{g/l}$, valores similares a los presentados en Tabla IV.32.

IV.2.1.3. Optimización de concentración de esporas y tiempo de incubación mediante la función deseabilidad

En este apartado, se pretende optimizar las respuestas de Bioensayo “B”, haciendo uso de la función deseabilidad, de modo tal de minimizar los LDs de ampicilina, cloxacilina y oxacilina (por ser superiores a sus LMRs), maximizar el LD de penicilina “G” a un nivel próximo a su LMR (puesto que los niveles de detección del bioensayo resultaron en todo momento inferiores a dicho valor). Además, se persigue como requisito maximizar los LDs de las tres TCs (CTC, OTC y TC) para evitar problemas de especificidad cruzada de Bioensayo “B” con el Bioensayo “T” (*B. cereus*) específico para tetraciclinas, que será optimizado en el apartado siguiente.

En Tabla IV.33 se resumen los criterios utilizados para la optimización de las respuestas individuales de Bioensayo “B” para cada antibiótico, así como la importancia adjudicada a cada fármaco en función de su frecuencia de uso en la terapéutica del ganado vacuno productor de leche, dado que dichas moléculas pueden ser detectadas por el método. Es decir, no se han considerado aquellas moléculas que el bioensayo no tiene sensibilidad para detectarla.

Entre las moléculas que interesa detectar (betalactámicos) o se desea alejar sus límites de detección (tetraciclinas); penicilina “G” es el antibiótico más empleado en

medicina veterinaria, por lo cual se le otorgó el máximo nivel de ponderación (5), mientras que ampicilina, cloxacilina, oxitetraciclina y tetraciclina fueron ponderadas con un nivel intermedio-bajo (2) y las menos empleadas (oxacilina y clortetraciclina) se le adjudicó el menor nivel (1) en la escala ordinal comprendida entre 1 y 5, que permite operar el software utilizado (Design Expert, 2009).

Tabla IV.33. Criterios utilizados para la optimización de Bioensayo “B” mediante la función deseabilidad

Antibiótico	Criterio	Importancia
Ampicilina	Minimizar	2
Cloxacilina	Minimizar	2
Oxacilina	Minimizar	1
Penicilina “G”	Maximizar	5
Clortetraciclina	Maximizar	1
Oxitetraciclina	Maximizar	2
Tetraciclina	Maximizar	2

Los límites de detección y los valores de la deseabilidad individual para cada fármaco estimados por la solución más deseable (“Log[E]”= 6.30 y “Ti”= 4.20) se resumen en la Tabla IV. 34.

Tabla IV. 34. Valores de deseabilidades parciales y límites de detección calculados para la optimización de Bioensayo “B”

Antibiótico	Deseabilidad parcial	LD
Ampicilina	0.8679	8.1
Cloxacilina	0.6370	48
Oxacilina	0.7619	27
Penicilina “G”	0.8558	3.5
Clortetraciclina	0.9135	5260
Oxitetraciclina	0.9439	1550
Tetraciclina	0.9329	1070

LD: Límite de detección ($\mu\text{g/l}$).

Los valores de deseabilidades parciales representan el grado de ajuste logrado para cada molécula en la optimización del método en términos de una respuesta multivariante para 7 antibióticos estudiados.

Se observan que, de los cuatro betalactámicos analizados, penicilina “G” (0.8558) y ampicilina (0.8679) mostraron mayores valores de deseabilidad parcial, revelando una mejor optimización del método para detectar dichos antibióticos en la leche. Además, se debe destacar que ambos betalactámicos se utilizan ampliamente en el tratamiento de las diversas patologías del ganado vacuno, motivo por el cual, esta solución contribuye a solucionar el problema de la detección de estas moléculas en la leche.

Los límites de detección calculados para las condiciones de trabajo más deseable fueron buenos para la penicilina “G” (3.8 $\mu\text{g/l}$) y oxacilina (27 $\mu\text{g/l}$), por ser próximos a sus LMRs (4 $\mu\text{g/l}$ y 30 $\mu\text{g/l}$, respectivamente), mientras que los niveles de detección de ampicilina (8.1 $\mu\text{g/l}$) y cloxacilina (48 $\mu\text{g/l}$) resultaron moderadamente superiores a sus LMRs (4 $\mu\text{g/l}$ y 30 $\mu\text{g/l}$, respectivamente).

Con respecto a las tetraciclinas, las deseabilidades parciales fueron muy buenas ($D_{\text{CTC}} = 0.9135$, $D_{\text{OTC}} = 0.9439$, $D_{\text{TC}} = 0.9329$), al haberse encontrado las condiciones de elaboración del bioensayo que no detecten estos fármacos (criterio la maximizar sus límites de detección, Tabla IV.33). Este hecho se corresponde con los elevados límites de detección ($LD_{\text{CTC}} = 5260 \mu\text{g/l}$, $LD_{\text{OTC}} = 1550 \mu\text{g/l}$, $LD_{\text{TC}} = 1070 \mu\text{g/l}$) que presenta el método para las condiciones más deseables, en comparación con los LMRs de las TCs (100 $\mu\text{g/l}$).

Haciendo uso de las deseabilidades parciales y de los factores de importancia (comprendidos entre 1 y 5), el programa calcula la deseabilidad global ($D_1 = 0.853$). La superficie de respuesta de esta función deseabilidad global en términos de las variables “Log[E]” y “Ti” y modelizada mediante los criterios de la Tabla IV.33, se muestra en la Figura IV.30.

Se aprecia que el máximo valor de esta función se encuentra ubicado para “Log[E]”= 6.30 y “Ti”= 4.20 h. También se visualiza que, para un nivel de esporas constante (“Log[E]”= 6.30), dicha función es estable para diferentes tiempos de lecturas, comprendidos entre 3.75 h y 4.5 h; mientras que la función deseabilidad es más sensible con los cambios en los niveles de esporas, ya que disminuye considerablemente cuando “Log[E]” aumenta desde 6.3 hasta 6.6.

Por todo ello, se deberá controlar rigurosamente la concentración de esporas en el momento de elaborar Bioensayo “B”, a fin de obtener un método más robusto. Por el contrario, pequeños cambios en los tiempos de incubación (desde 3.75 h hasta 4.5 h) por parte del usuario del método, no tendrán mayores repercusiones en la respuesta.

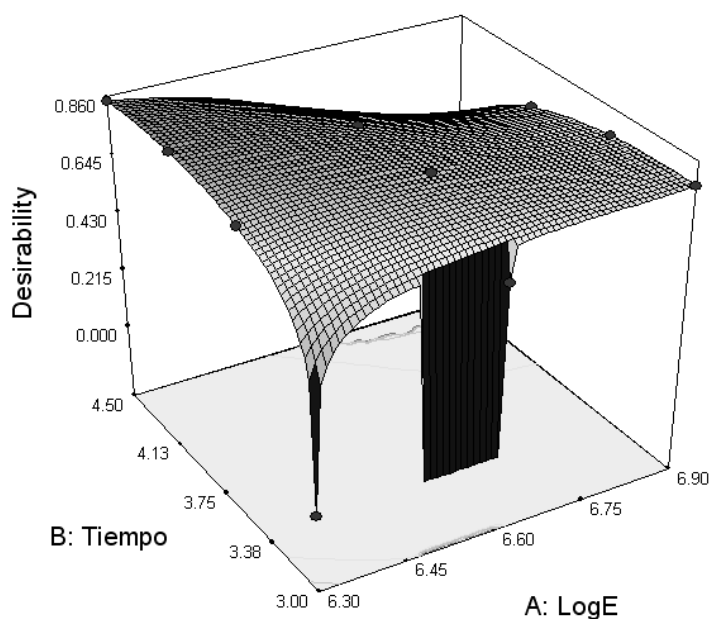


Figura IV.30. Efectos de Logaritmo de esporas y Tiempo de incubación sobre la deseabilidad global de Bioensayo “B” (*G. stearothermophilus*).

IV.2.2. DISEÑO DE BIOENSAYO “T” (*B. cereus*) PARA LA DETECCIÓN DE TETRACICLINAS EN LECHE

Para la detección de residuos de tetraciclinas en leche se seleccionó *B. cereus* por tratarse de un microorganismo que presenta buena sensibilidad para estos antibióticos. En los siguientes apartados se optimizará un bioensayo de respuesta dicotómica para obtener una respuesta en un tiempo inferior a 6 horas.

IV.2.2.1. Efecto de la concentración de esporas sobre el límite de detección de la tetraciclina en leche y el tiempo de respuesta de Bioensayo “T”

Los resultados de la aplicación del modelo logístico a las frecuencias relativas de resultados positivos a Bioensayo “T” utilizado con muestras de leche fortificadas con TCs, señalan diferencias significativas ($p < 0.05$) para las variables concentración de “TC” (1398.7643), “Log[E]” (66.5809) y $(\text{Log}[E])^2$ (51.5909). La ecuación que relaciona las frecuencias de resultados positivos del bioensayo como una función de las variables predichas por el modelo logístico es la siguiente:

$$\text{Logit [P]} = 7.1458 + 0.0272 [\text{TC}] - 3.8432 \text{Log [E]} + 0.3183 (\text{Log [E]})^2 \quad (C= 88.4\%)$$

En la medida que se incrementa el valor de "Log[E]", disminuye la frecuencia de resultados positivos al método (valor negativo del coeficiente " β "). Esto se debe a que el incremento en la cantidad de microorganismos presentes en el medio de cultivo requiere de concentraciones más elevadas de TCs para producir cambios en la respuesta del test. Por el contrario, el aumento de $(\text{Log[E]})^2$ produce un incremento en la frecuencia de resultados positivos (valor positivo del coeficiente " β ").

La Figura IV.31 muestran las curvas logísticas construidas mediante la aplicación de la ecuación anterior para diferentes niveles de esporas. A partir de esta gráfica se deduce que un aumento en "Log[E]" origina un corrimiento de las curvas dosis respuesta hacia mayores concentraciones de TC, también se observa que las curvas logísticas se hallan muy próximas cuando "Log[E]" están comprendidas entre 6.0 y 6.7, poniendo de manifiesto cierta estabilidad en la respuesta del método.

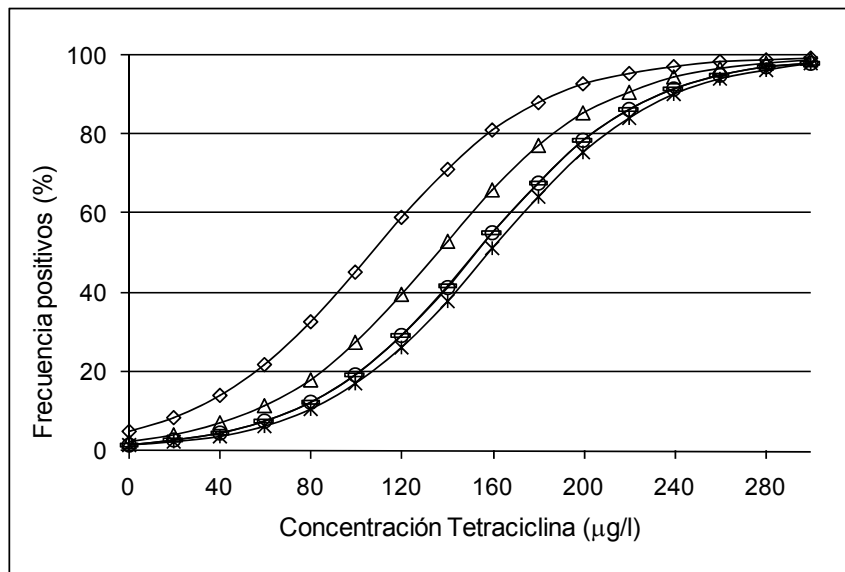


Figura IV.31. Efecto de la concentración de esporas sobre la curva dosis-respuesta de tetraciclina en leche analizadas mediante Bioensayo "B" (*B. cereus*). (\diamond : Log [E]= 3.9; Δ : Log [E]= 4.6; \circ : Log [E]= 5.3; \ast : Log [E]= 6.0; \times : Log [E]= 6.7).

Los límites de detección de los bioensayos calculados a partir del modelo logístico se muestran en la Tabla IV.35. Haciendo uso de los LDs se construyó la Figura IV.32, donde se observa que el incremento del "Log[E]" en el medio de cultivo produce un aumento en los LDs, hasta llegar a un nivel "E" donde se mantiene aproximadamente constante. En dicha zona, los incrementos "E" en el medio no

producen prácticamente cambios en los LDs del bioensayo. La ecuación matemática que presenta el efecto de “Log[E]” sobre los LDs del bioensayo es la siguiente:

$$LD = 228.439 - 508.17/\text{Log}[E] \quad R^2 = 0.9670$$

Tabla IV.35. Efecto de Log[E] sobre los límites de detección de tetraciclina en leche y el tiempo de respuesta para Bioensayo “T” (*B. cereus*)

Log [Esporas]	LD ($\mu\text{g/l}$)	Tiempo (h)
3.90	93	9.0
4.60	122	7.0
5.30	139	6.0
6.00	145	5.5
6.70	146	5.0

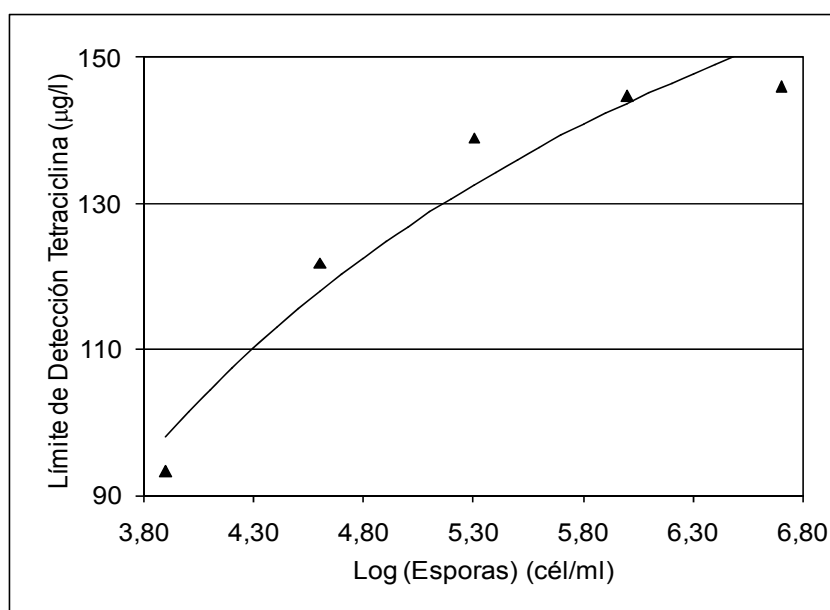


Figura IV.32. Efecto de la concentración de esporas sobre los límites de detección de tetraciclina en leche utilizando Bioensayo “T” (*B. cereus*).

El tiempo de incubación necesario para producir el cambio en la respuesta de los indicadores presenta un comportamiento inverso. En efecto, un incremento en “Log[E]” produce una mayor acidificación del medio de cultivo, acompañado de un adelanto en el cambio de color de los indicadores ácido-base y una disminución en el tiempo de respuesta de Bioensayo “T”. Por ello, en la Figura IV.33 se muestra el efecto

que produce “Log[E]” sobre “Ti” (tiempo de incubación) del método, así como la ecuación matemática de ajuste. El incremento de la concentración de esporas disminuye el tiempo de respuesta hasta valores comprendidos entre 5.25 y 5.5 horas. La expresión matemática que relaciona el tiempo de incubación como una función del “Log[E]” es la siguiente:

$$T_i = 10^{(2.92249 - 0.202396 * \text{Log}[E])} \quad R^2 = 0.9727$$

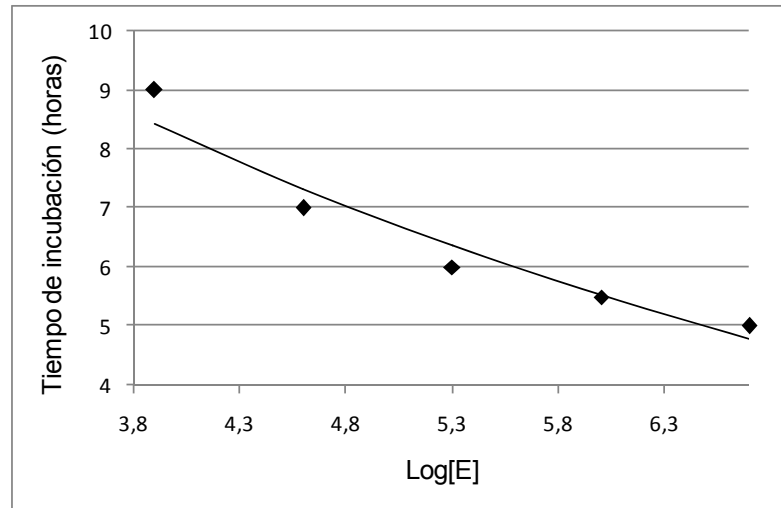


Figura IV.33. Efecto de la concentración de esporas sobre el tiempo de respuesta de Bioensayo “T” (*B. cereus*) utilizado para la detección de tetraciclina en leche.

Langeveld *et al.* (2005) cuando evalúan el efecto de la concentración de esporas de *G. stearothermophilus* C-953 sobre el tiempo de respuesta del bioensayo que emplea púrpura de bromocresol como indicador ácido-base, observan una disminución en el tiempo de respuesta desde 160 minutos hasta 120 minutos en la medida que se incrementa la concentración de esporas (desde [E]= $1.5 \cdot 10^7$ esporas/ml hasta [E]= $4.0 \cdot 10^7$ esporas/ml). En forma similar, dichos autores señalan que la sensibilidad para la detección de penicilina “G” se mantiene constante ($3 \mu\text{g/l}$). Esta constancia en el límite de detección se presenta cuando se trabaja a concentraciones muy elevadas de esporas, donde prácticamente el bioensayo manifiesta una creciente capacidad amortiguadora frente a cambios apreciables en las concentraciones de antimicrobianos presentes en la leche, es decir, el bioensayo pierde variabilidad operativa frente a diferentes condiciones de diseño experimental.

Con el propósito de obtener un bioensayo con adecuada sensibilidad hacia las TCs y un “Ti” breve, se procedió a evaluar los efectos que producen diversos factores de diseño sobre la curva dosis respuesta de TC en leche. Para ello, no se eligió el

nivel más elevado de esporas, ya que, la posibilidad de optimizar los límites de detección de las tetraciclinas a los LMRs resulta más dificultosa debido a la gran estabilidad de la respuesta producida por una alta concentración de esporas (el método se vuelve menos sensible).

IV.2.2.2. Efecto de los principales factores que afectan a la respuesta de Bioensayo "T"

En la Tabla IV.36 se muestran los resultados del tratamiento estadístico aplicado al diseño fraccionado para seleccionar aquellos factores significativos en la optimización del método. Se obtuvieron diferencias significativas para los factores "Log[E]" ($\chi^2=367.4260$, $p=0.0001$) y "CAP" ($\chi^2=123.2178$, $p=0.0001$), mientras que el resto de factores no mostraron efectos significativos sobre la respuesta del bioensayo.

El modelo logístico que relaciona las frecuencias relativas de resultados positivos con los factores significativos es el siguiente:

$$\text{Logit [P]} = 2.9275 + 0.0296 [\text{TC}] - 1.7134 [\text{Log E}] + 0.00169 [\text{CAP}] \quad (\text{C} = 90.1\%)$$

Tabla IV.36. Parámetros estadísticos del diseño factorial fraccionado utilizado en la optimización de Bioensayo "T" (*B. cereus*)

Factores	Valor " χ^2 "	Valor "p"
Glucosa	0.4326	0.5107
Indicadores	2.8676	0.9040
Log[E]	367.4260	0.0001
CAP	123.2178	0.0001
Volumen medio	1.2826	0.2574
Temperatura	2.6498	0.1068

El incremento de la concentración de TC produce un aumento en los resultados positivos del método, de igual forma que la concentración de "CAP". El efecto de este antimicrobiano sobre la disminución de los LDs de las TCs se observó en el Experimento 1.2 del apartado IV.1.2.2. Por el contrario, la concentración de esporas trae aparejado un aumento en los LDs de la TC (disminución de las frecuencias de resultados positivos).

En Figura IV.34 se observan los efectos de "Log[E]" y "CAP" sobre las frecuencias de resultados positivos a Bioensayo "T". La disminución en la concentración de esporas (Log[E]= 5.3) y el incremento en los niveles de "CAP" ("CAP"= 400 µg/l) en el medio de cultivo, producen un desplazamiento de la curva logística hacia la izquierda, acompañado de una mayor sensibilidad para la detección de residuos de tetraciclinas en la leche.

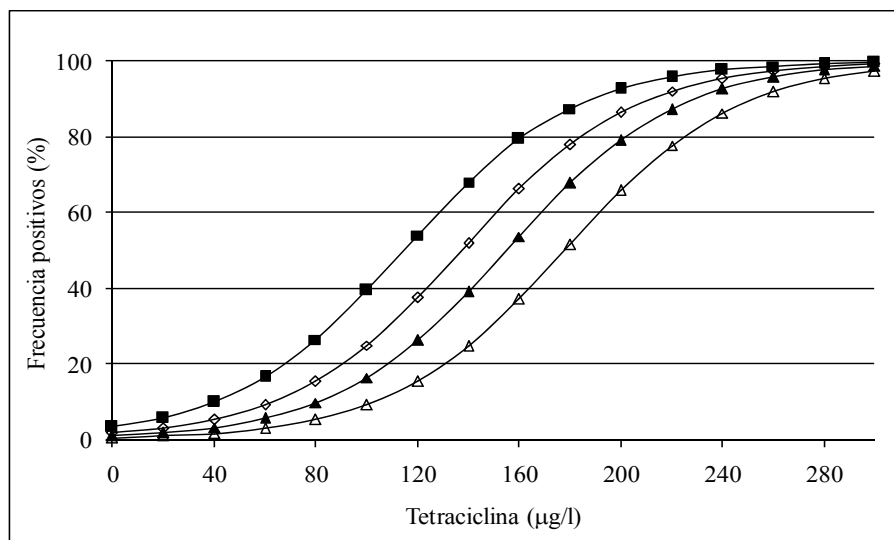


Figura IV.34. Efecto de la concentración de esporas y "CAP" sobre la curva dosis-respuesta de tetraciclina en leche analizada con Bioensayo "T" (*B. cereus*). (◇: Log [E]= 5.3 y CAP=0 µg/l; ■: Log [E]= 5.3 y [CAP]=400 µg/l; Δ: Log [E]= 6.0 y [CAP]=0 µg/l; ▲: Log [E]= 6.0 y CAP=400 µg/l).

Por ello, en el próximo apartado se procederá a analizar con mayores detalles los efectos de la concentración de esporas y cloranfenicol en el medio de cultivo, con el objetivo de lograr un bioensayo que presente elevada selectividad y adecuado nivel de detección para las tetraciclinas en leche.

IV.2.2.3. Optimización del Bioensayo "T" (*B. cereus*) mediante un diseño según la matriz de Doehlert

- **Diseño Doehlert aplicado al estudio selectividad del Bioensayo "T":** Los resultados obtenidos después de analizar duplicados 192 muestras de leche libres de antibióticos se muestran en la Tabla IV.37. La selectividad para Bioensayo "T" preparados con 800 µg/l de CAP - Log[E]=5.82 fue más baja (98.4%) que el resto de

los bioensayos (99.5%), pero resultó equivalente a la observada para el método Copan CH-ATK® (98.4%).

Tabla IV.37. Efectos de CAP y Log[E] sobre la selectividad de Bioensayo “T”

CAP (µg/l)	Log[E]	Nº Muestras	Positivo	Negativo	Selectividad (%)
200	5.12	192	1	191	99.5
600	5.12	192	2	190	98.9
0	5.82	192	1	191	99.5
400	5.82	192	1	191	99.5
800	5.82	192	3	189	98.4
200	6.52	192	1	191	99.5
600	6.52	192	2	190	98.9
Copan CH-ATK®		192	3	189	98.4

Selectividad: “resultados negativos/número de muestras”.

Otros autores emplean niveles similares de “CAP” en el medio de cultivo, Así, Nouws *et al.* (1999a,b) fortifican el medio de la placa de Petri que contiene esporas de *B. cereus* con 500 µg/l de “CAP”, añadiendo además una disolución concentrada de “CAP” a la muestra de leche que se desea analizar, de modo tal de lograr una concentración final de 2000 µg/l.

Las selectividades de los microplacas fortificadas con 400 µg/l de “CAP” (99.5%) y 600 µg/l de CAP (98.9%) resultaron superior a los valores de 98% (Sischo y Burns, 1993), 95% (Charm y Zomer, 1995) y 98% (Roca *et al.*, 2007) determinados con el método Delvotest® en muestras de leche de vaca, señalando un adecuado nivel de trabajo para lograr una elevada selectividad del bioensayo.

- Diseño Doehlert aplicado al estudio de límites de detección del Bioensayo “T”:

La utilización de una matriz de Doehlert permite estimar los efectos lineales cuadráticos y las interacciones de los factores mediante un número reducido de experimentos. Los resultados obtenidos mediante la aplicación del modelo logístico a las frecuencias de resultados positivos a Bioensayo “T” (*B. cereus*) se resumen en la Tabla IV.38.

Para las tres TCs estudiadas, “Log[E]”, $(\text{Log}[E])^2$ y “CAP” afectaron en forma significativa ($p < 0.05$) a la respuesta del método. Por el contrario los efectos

cuadráticos de “CAP” y la interacción “Log[E]*CAP” no afectaron en forma significativa ($P>0.05$) a la respuesta del método.

Tabla IV.38. Parámetros estadísticos obtenidos mediante la aplicación del modelo de regresión logística en la optimización de Bioensayo “T” (*B. cereus*) mediante un diseño de matriz de Doehlert

Tetraciclina	Efecto	Valor “F”	Valor “p”
Clortetraciclina	Log[E]	33.7989	0.0001
	CAP	14.5223	0.0001
	(Log[E]) ²	39.6083	0.0001
	CAP ²	0.1162	0.7332
	Log[E]*CAP	2.0391	0.1548
Oxitetraciclina	Log[E]	7.9255	0.0001
	CAP	40.8193	0.0001
	(Log[E]) ²	7.0112	0.0081
	CAP ²	2.7518	0.0987
	Log[E]*CAP	0.0427	0.8363
Tetraciclina	Log[E]	56.3486	0.0001
	CAP	69.9678	0.0001
	(Log[E]) ²	53.0256	0.0001
	CAP ²	0.4973	0.4807
	Log[E]*CAP	2.3595	0.1245

La Tabla IV.39 muestra las ecuaciones obtenidas mediante la aplicación de la opción stepwise del modelo de regresión logístico a los datos obtenidos en el diseño Doehlert.

Con respecto al término “ β_1 ”, se debe destacar que resultó positivo para las tres tetraciclinas, aunque su magnitud fue mayor para la OTC ($\beta_{1, \text{OTC}} = 0,1084$) que para TC ($\beta_{1, \text{TC}} = 0.0762$) y CTC ($\beta_{1, \text{CTC}} = 0.0260$), indicando una mayor incremento en la pendiente de la curva dosis-respuesta por parte de OTC, y por lo tanto una mayor sensibilidad de *B. cereus* para detectar dicha molécula.

Tabla IV. 39. Ecuaciones logísticas de las curvas dosis-respuesta de tetraciclinas en leche analizadas mediante Bioensayo “T” (*B. cereus*)

Tetraciclinas	$\text{Logit } [P_{ijkl}] = \beta_0 + \beta_1 [\text{TCs}]_i + \beta_2 \text{Log}[E]_j + \beta_3 [\text{CAP}]_k$ $+ \beta_{22} (\text{Log}[E])_{jj}^2 + \beta_{33} [\text{CAP}]_{kk}^2 + \beta_{23} \text{Log}[E]_*[\text{CAP}]_{jk}$	C
Clortetraciclina	$\text{Logit } [P] = 123.539 + 0.0260 [\text{CTC}] + 0.0023*[\text{CAP}]$ $- 44.4752*\text{Log}[E] + 3.6869*(\text{Log } [E])^2$	83.8
Oxitetraciclina	$\text{Logit } [P] = 70.5141 + 0.1084 [\text{CTC}] + 0.0051*[\text{CAP}]$ $- 26.8518*\text{Log}[E] + 2.1622*(\text{Log } [E])^2$	89.6
Tetraciclina	$\text{Logit } [P] = 176.642 + 0.0762 [\text{CTC}] + 0.0057*[\text{CAP}]$ $- 62.6856*\text{Log}[E] + 5.1989*(\text{Log } [E])^2$	86.2

C: Coeficiente de concordancia porcentual

Además, para las tres tetraciclinas, se evidencia un efecto negativo para el término “Log[E]”, señalando un desplazamiento de las curvas logística hacia mayores concentraciones de TCs, y un efecto positivo para el término $(\text{Log } [E])^2$, denotando la presencia de un máximo con la concentración de TCs. Por su parte, el efecto de “CAP” fue positivo para las tres tetraciclinas, señalando un desplazamiento de las curvas logísticas hacia concentraciones menores de TCs, es decir, una disminución en los límites de detección del bioensayo, conforme se incrementa el nivel de este antimicrobiano en el medio de cultivo.

Sin embargo, se debe señalar que la magnitud del término “ β_3 ” fue mayor para OTC ($\beta_{3, \text{OTC}} = 0.0051$) y TC ($\beta_{3, \text{TC}} = 0.0057$) que para CTC ($\beta_{3, \text{CTC}} = 0.0023$), señalando una mayor disminución en los límites de detección por acción del CAP en las dos primeras moléculas de tetraciclinas que en la última. Por ello, se podrá optimizar mejor los límites de detección de OTC y TC a un nivel cercano a su LMR (100 $\mu\text{g/l}$), en comparación con CTC.

Los coeficientes de concordancia fueron adecuados para los tres modelos logísticos (83.8% clortetraciclina, 89.6% oxitetraciclina y 86.2% tetraciclina).

Para visualizar los efectos de “Log[E]” y “Ti” sobre las curvas dosis respuestas, se construyó Figura IV.35. Las curvas logísticas se ubican a la izquierda para bajos niveles de esporas ($\text{Log}[E]=5.12$) y elevada concentración de “CAP” (600 $\mu\text{g/l}$).

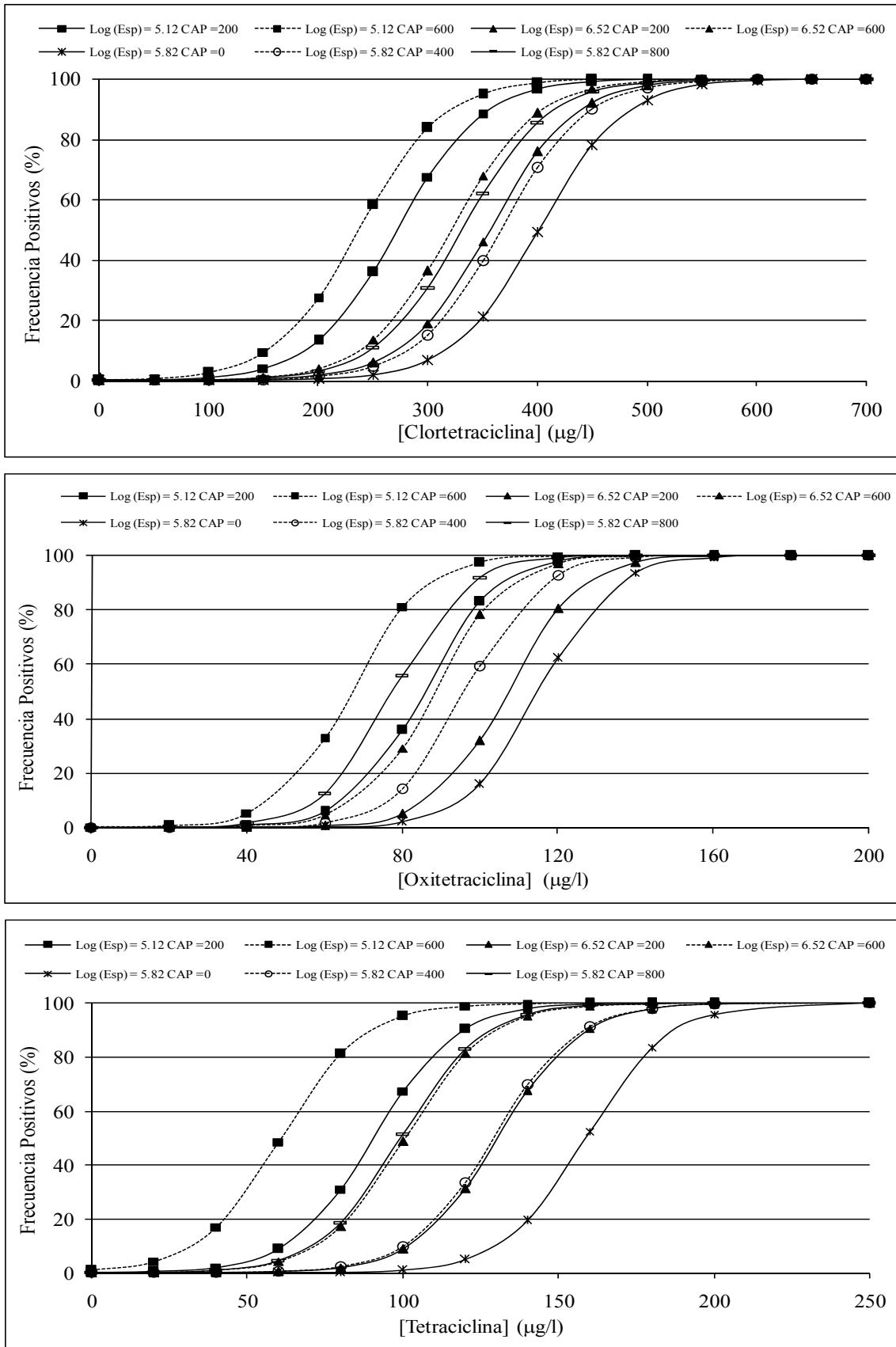


Figura IV.35. Efecto del logaritmo de la concentración de esporas y el CAP sobre la curva dosis-respuesta de tetraciclinas en leche analizada con Bioensayo "T" (*B. cereus*).

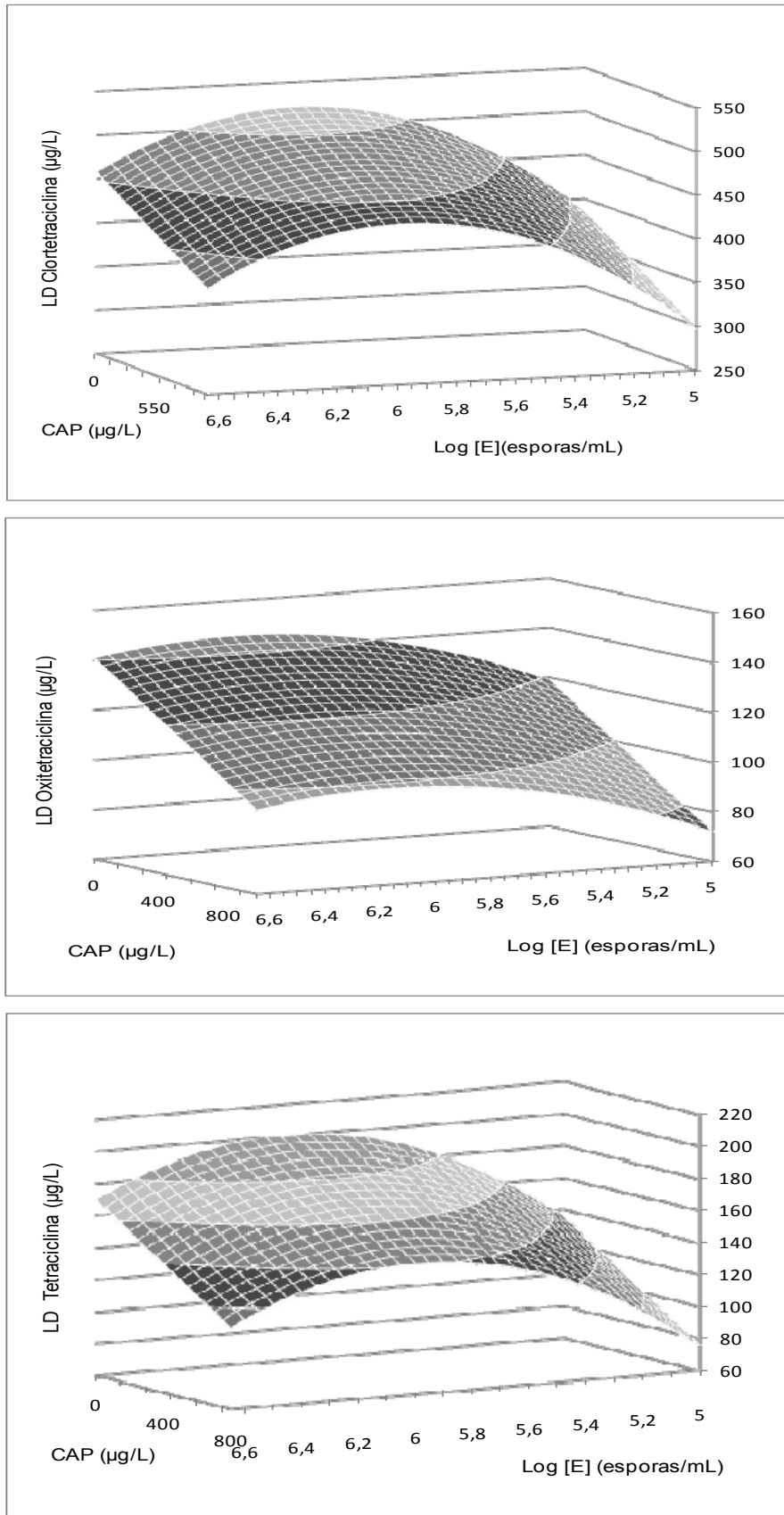


Figura IV.36. Superficies de respuestas que muestran los efectos de la concentración de esporas y CAP sobre los límites de detección de tetraciclinas de Bioensayo "T" (*B. cereus*).

Por el contrario, las curvas obtenidas para elevada concentración de esporas y bajo nivel de “CAP” ($\text{Log}[E]= 6.52$, “CAP”=200 $\mu\text{g/l}$), al igual que las calculadas para un valor intermedio de $\text{Log}[E]$ y sin “CAP” ($\text{Log}[E]= 5.82$, “CAP”=0), se desplazan hacia la derecha, manifestando menor sensibilidad del método para la detección de TCs.

La Figura IV.36 muestra los efectos que producen “ $\text{Log}[E]$ ” y “Ti” sobre los LDs de las TCs en leche. En los tres casos se evidencia un efecto cuadrático para la variable “ $\text{Log}[E]$ ” (según se presentó en Tabla IV.38 y Figura IV.32). Para concentraciones intermedias de “E”, los LDs se alejan con respecto al LMR (100 $\mu\text{g/l}$), obteniéndose los mejores niveles de detección para bajas concentraciones de esporas y elevados niveles de “CAP”.

La Tabla IV.40 presenta los límites de detección de las tetraciclinas para las siete corridas del diseño Doehlert. Se observa que, para una baja concentración de esporas ($\text{Log}[E]= 5.12$) y 600 $\mu\text{g/l}$ de “CAP”, los LDs son mínimos ($\text{LD}_{\text{CTC}}=351$ $\mu\text{g/l}$, $\text{LD}_{\text{OTC}}=94$ $\mu\text{g/l}$ y $\text{LD}_{\text{TC}}=99$ $\mu\text{g/l}$). También, los LDs descienden ($\text{LD}_{\text{CTC}}=445$ $\mu\text{g/l}$, $\text{LD}_{\text{OTC}}=105$ $\mu\text{g/l}$ y $\text{LD}_{\text{TC}}=137$ $\mu\text{g/l}$) para una máxima concentración de esporas ($\text{Log}[E]= 5.82$ y un mayor nivel de “CAP” (800 $\mu\text{g/l}$), tal como se observa en la Figura IV.36.

Tabla IV. 40. Efectos de la concentración de esporas y tiempo de incubación sobre los límites de detección ($\mu\text{g/l}$) de tetraciclinas en leche mediante Bioensayo “T” (*B.cereus*)

Log[E]	CAP ($\mu\text{g/l}$)	Tetraciclinas		
		Clortetraciclina	Oxitetraciclina	Tetraciclina
5.12	200	385	113	129
5.12	600	351	94	99
5.82	0	514	143	197
5.82	400	479	124	168
5.82	800	445	112	138
6.52	200	469	134	169
6.52	600	435	110	138

De esta situación, se plantea una doble posibilidad de elaborar el bioensayo con buena sensibilidad para detectar TCs en la leche con baja concentración de esporas y 600 $\mu\text{g/l}$ de “CAP”, o con una elevada concentración de esporas y un mayor nivel de “CAP”.

Con el propósito de definir las condiciones óptimas para la elaboración del bioensayo, se utilizó la función deseabilidad como un instrumento estadístico que permita elegir los mejores niveles de “Log[E]” y “CAP” a fin de aproximar los límites de detección de las tetraciclinas a sus correspondientes LMRs.

IV.2.2.4. Optimización de concentración de esporas y tiempo de incubación mediante la función deseabilidad

De forma similar al procedimiento utilizado para optimización de Bioensayo “B” para la detección de residuos de betalactámicos, se aplicó la función deseabilidad para optimizar los LDs de las tres tetraciclinas a su LMR (100 µg/l).

Debido a que los LDs de OTC y TC fluctúan en torno a su LMR (Tabla IV.40), se empleó como criterio el “Ajuste a un valor fijo” (100 µg/l), mientras que para la CTC, el criterio fue diferente, ya que los LDs siempre fueron superiores a su LMR (Tabla IV.40). Por ello, para esta molécula, se eligió el criterio de “Minimizar” la respuesta. A modo de síntesis, en la Tabla IV.41 se muestra los criterios utilizados en la optimización de las respuestas individuales de las TCs.

Tabla IV.41. Criterios utilizados para la optimización de Bioensayo T mediante la función deseabilidad

Antibiótico	Criterio	Importancia
Clortetraciclina	Minimizar	1
Oxitetraciclina	Ajustar LMR	5
Tetraciclina	Ajustar LMR	5

Además, en virtud de la frecuencia de aplicación de las tetraciclinas en el ganado vacuno (Zorraquino *et al.*, 2007) y teniendo en cuenta que Bioensayo “T” detectará estas moléculas, se ponderó a cada una de ellas con un grado de importancia relativo dentro de la escala “1 a 5” que permite utilizar el software Design-Expert (2009). Por ello, OTC y TC fueron ponderadas con el máximo valor de importancia (5), mientras que CTC tuvo la mínima ponderación (1), tal como se muestra en la Tabla IV.41.

Los resultados de la optimización con la función deseabilidad mostraron dos buenas soluciones de trabajo. La primera de ellas (Solución D1) presenta un valor muy elevado de deseabilidad global ($D = 0.949$) y se logra cuando se trabaja con $\text{Log}[E]=$

5.12 y un nivel de CAP=470 $\mu\text{g/l}$. La segunda (Solución D2) posee un valor inferior de deseabilidad global ($D = 0.780$) cuando los bioensayos se elaboran con $\text{Log}[E]= 6.52$ y 800 $\mu\text{g/l}$ de “CAP”. Estas dos posibilidades de trabajo con niveles de detección similares a los LMRs se visualizaron en la Figura IV.36.

Los valores individuales de la deseabilidad, así como los límites de detección de las tres TCs ensayadas para las dos soluciones de optimización seleccionadas por la función deseabilidad se exponen en Tabla IV.42.

Tabla IV. 42. Valores de deseabilidad específicos y límites de detección calculados para la optimización de Bioensayo “T”

Tetraciclinas	Solución D1		Solución D2	
	Deseabilidad	LD	Deseabilidad	LD
Clortetraciclina	0.929	362	0.593	417
Oxitetraciclina	1.000	100	0.859	106
Tetraciclina	0.904	109	0.748	125

La primera solución (D1) presenta mejores deseabilidades parciales para cada tetraciclina que la segunda solución (D2). Además, los LDs de la OTC y TC (tetraciclinas más utilizadas en la terapéutica del ganado vacuno) coinciden con sus LMRs (100 $\mu\text{g/l}$) para D1, mientras que los límites calculados para D2 resultaron levemente superiores. Por ello, se recomienda preparar el bioensayo con las condiciones brindadas por D1, es decir, trabajar con $\text{Log}[E] = 5.12$ y “CAP”= 470 $\mu\text{g/l}$.

Con el propósito de visualizar las soluciones de la deseabilidad, se construyó la Figura IV.37. En ella se representa la superficie de respuesta de la función deseabilidad global. El máximo valor de deseabilidad global ($\text{Log}[E] = 5.12$ y $[\text{CAP}] = 470 \mu\text{g/l}$) coincide con la representación de la Figura IV.36, puesto que, la máxima deseabilidad se corresponde con los mínimos valores de límites de detección de las TCs observados en sus correspondientes superficies de respuestas.

Esta función deseabilidad decae considerablemente en la medida que se incrementa la concentración de esporas, motivo por el cual esta variable debe ajustarse en forma correcta en el momento de elaborar el Bioensayo “T”.

Los resultados obtenidos en este trabajo ajustan a los LMRs de la TCs en leche, sin embargo, Suhren y Heeschen (1993) alcanzan a detectar 50 $\mu\text{g/l}$ de tetraciclina y 50 $\mu\text{g/l}$ de oxitetraciclina cuando elaboran un bioensayo que utiliza 10^2 esporas/ml de *B.*

cereus y trifeniltetrazolium como indicador redox en un bioensayo en microplacas ELISA. Dichos autores emplean oxalato de amonio como agente secuestrante de calcio a la leche para mejorar la sensibilidad del método hacia las TCs, en lugar del “CAP” utilizado en el presente trabajo.

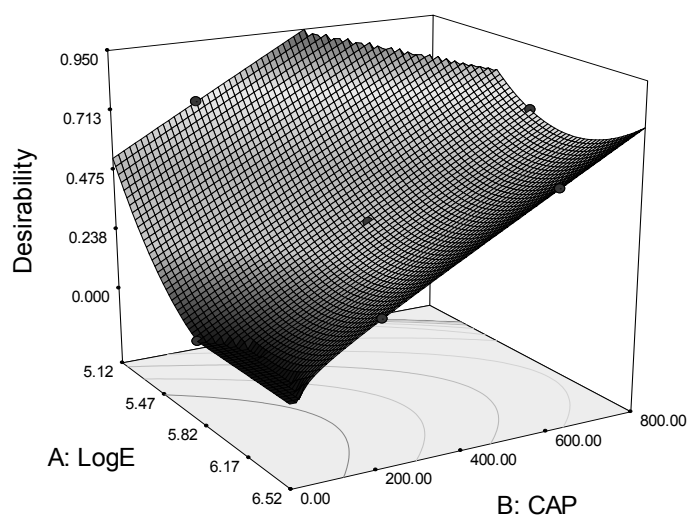


Figura IV.37. Efectos de Log[E] y concentración de cloranfenicol sobre la deseabilidad global para Bioensayo “T” (*B. cereus*).

Se debe destacar que, estos autores, al trabajar con una concentración de esporas muy baja en comparación con este bioensayo, logran disminuir notablemente los límites de detección de las TCs, en detrimento de la rapidez de la respuesta, ya que su método emplea elevados tiempos de incubación (entre las 16 y 24 horas).

Además, la disminución en los LDs de las tetraciclinas del bioensayo propuesto por Suhren y Heeschen (1993) por debajo de sus LMRs, no presenta un beneficio al método, ya que se trata de un screening de respuesta dicotómica (positivo o negativo), pudiendo llevar a resultados “falsos no conformes o falsos violativos”, es decir, acusar como positiva una muestra de leche que contenga un nivel de TC u OTC comprendido entre 50 y 100 $\mu\text{g/l}$). En este sentido, la aplicación de técnicas del diseño experimental y el uso de la función deseabilidad, permiten optimizar la respuesta de un bioensayo a un nivel de detección equivalente a su LMR y disminuir considerablemente los tiempos de incubación del método (5 horas vs 16-24 horas).

En el Sistema Microbiológico Multiplaca (SMMP) propuesto por Nouws *et al.* (1998, 1999a,b) se detectan 30 $\mu\text{g/l}$ de OTC, 30 $\mu\text{g/l}$ de TC y 10 $\mu\text{g/l}$ de CTC cuando

utilizan un método de difusión en placas de Petri que contiene 10^5 esporas/ml de *B. cereus* y 500 $\mu\text{g/l}$ de "CAP", con un tiempo de respuesta comprendido entre 18 y 24 horas a 30°C, superior al obtenido en este trabajo (5 horas a 40°C). Para otro SMMP, Gaudin *et al.* (2004) cuando utilizan 10^4 esporas/ml de *B. cereus* en un ensayo de difusión en placas de Petri, detectan 200-250 $\mu\text{g/l}$ de TC, 200-250 $\mu\text{g/l}$ de TC y 50 $\mu\text{g/l}$ de CTC en leche, para 18-24 horas de incubación a 30°C de temperatura.

IV.2.3. DISEÑO DE BIOENSAYO "S" (*B. subtilis*) PARA LA DETECCIÓN DE SULFAMIDAS EN LECHE

Para la detección de residuos de sulfamidas en leche se utilizó *B. subtilis* por tratarse del microorganismo más recomendado para esta familia de antibióticos. En los siguientes apartados se optimizará un bioensayo de respuesta dicotómica para la detección de residuos de sulfamidas en leche.

IV.2.3.1. Efecto de la concentración de esporas sobre el límite de detección de las sulfamidas en la leche y el tiempo de respuesta del Bioensayo "S"

La aplicación del modelo de regresión logístico de segundo orden respecto a la variable "Log[E]", para evaluar el efecto de concentración de sulfatiazol (STZ) sobre las frecuencias relativas de resultados positivos a Bioensayo "S" mostró efectos significativos ($p < 0.05$) para las variables concentración de STZ en la leche ($\chi^2 = 502.061$) y (Log[E])² ($\chi^2 = 207.61$). La siguiente ecuación relaciona la frecuencia de resultados positivos del bioensayo como una función de las variables predictivas:

$$\text{Logit [P]} = 2.3619 + 0.00089 * [\text{STZ}] - 0.2659 * (\text{Log [E]})^2 \quad (\text{C} = 86.6\%)$$

La expresión anterior señala que el incremento de la concentración de esporas produce un desplazamiento de la curva logística hacia la derecha acompañado de un aumento en los LDs del método (valor negativo del coeficiente " β "), al igual que se observó en el estudio de *B. cereus*. Este incremento en la concentración de esporas pone de manifiesto la necesidad de utilizar mayores concentraciones de STZ para producir cambios visibles en la respuesta de método.

El efecto de la concentración de esporas sobre las curvas dosis-respuestas del STZ en leche para el Bioensayo "S" se muestran en la Figura IV.38, donde se visualiza el desplazamiento de de las curvas dosis respuesta hacia mayores concentraciones de STZ, en la medida que se incrementa "Log[E]".

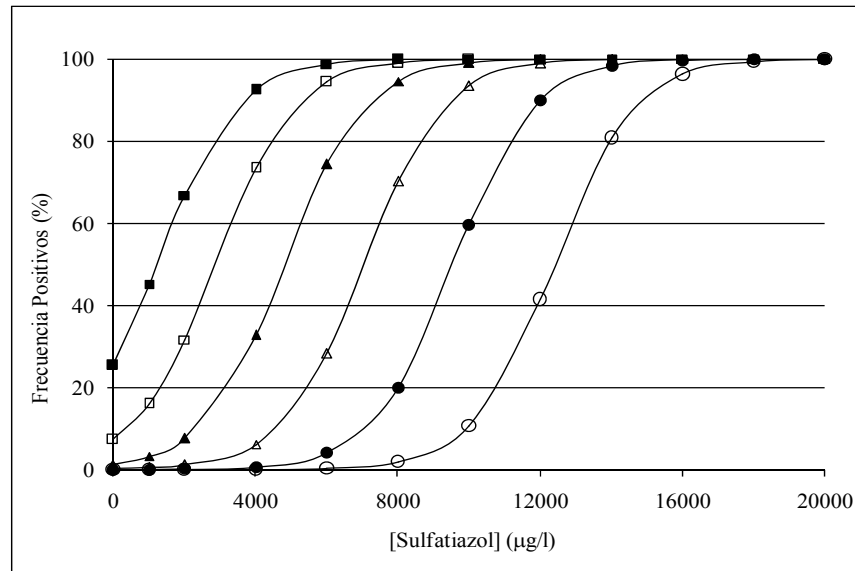


Figura IV.38. Efecto de la concentración de esporas sobre la curva dosis-respuesta de sulfatiazol en leche analizadas mediante Bioensayo "S" (*B. subtilis*). (■: Log [E]= 3.6; □: Log [E]= 4.3; ▲: Log [E]= 5.0; △: Log [E]= 5.7; ●: Δ: Log [E]= 6.4; ○: Δ: Log [E]= 7.1).

Haciendo uso de la ecuación anterior, se calcularon los LDs del bioensayo para diferentes valores de Log[E] en el medio de cultivo, que se resumen en la Tabla IV.43. Además se pueden observar en dicha tabla que incrementos en los valores de Log[E], producen una disminución en los tiempos de respuesta del método. Este hecho se debe a que un mayor nivel de esporas produce cambios más rápidos en el potencial redox del medio, que pequeñas concentraciones de esporas.

Tabla IV.43. Efecto de Log [E] sobre los límites de detección de STZ en leche y el tiempo de respuesta para Bioensayo "S" (*B. subtilis*)

Log [Esporas]	LD (µg/l)	Tiempo (h)
3.60	10.7	11.0
4.30	8.7	8.5
5.00	7.3	7.0
5.70	6.2	6.0
6.40	5.4	5.5
7.10	4.7	5.2

En forma similar, para bioensayos de respuesta dicotómica que hacen uso de indicador ácido-base (púrpura de bromocresol), Langeveld *et al.* (2005) señalan disminuciones en el tiempo de incubación cuando incrementan los niveles de esporas de *G. stearothermophilus*.

Haciendo uso de los LDs de la Tabla IV.43, se construyó la Figura IV.39, donde se aprecia que incrementos en los niveles de esporas del medio de cultivo producen un aumento en los LDs de Bioensayo "S". La siguiente expresión muestra el efecto de "Log[E]" sobre los límites de detección de Bioensayo "S":

$$LD = -1955.73 + 4.37225 \cdot \text{Log}[E] + 297.493 \cdot (\text{Log}[E])^2 \quad R^2 = 0.9998$$

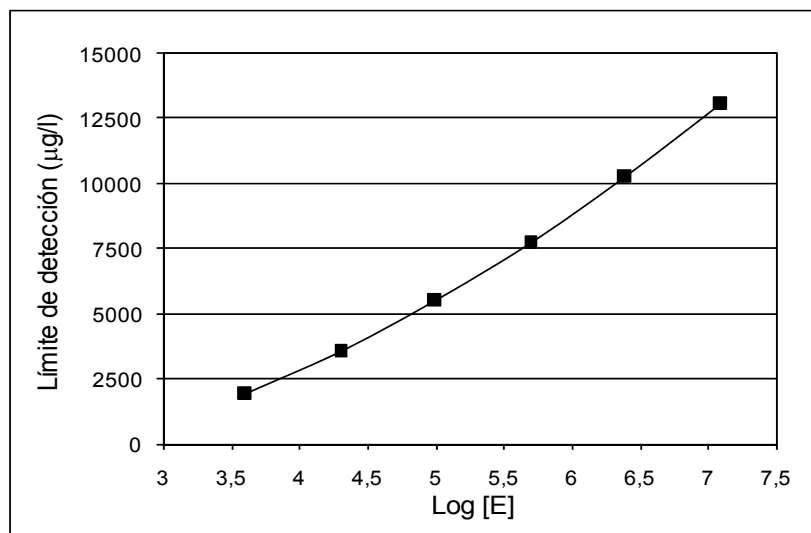


Figura IV.39. Efecto de la concentración de esporas sobre los límites de detección de sulfatiazol en leche utilizando Bioensayo "S" (*B. subtilis*).

La Tabla IV.43 permite apreciar, además, la disminución en el tiempo de incubación del método conforme se incrementan los niveles de esporas en el medio de cultivo. La ecuación matemática que vincula el tiempo de incubación de Bioensayo "S" con la transformación logarítmica de la concentración de esporas es la siguiente:

$$Ti = -1.45031 + 43.6666 / \text{Log}[E] \quad R^2 = 0.9906$$

La Figura IV.40 representa el efecto que produce "Log[E]" sobre los tiempos de incubaciones de Bioensayo "S" y la curva obtenida a partir de la ecuación matemática que ajusta dichos valores.

En efecto, el incremento en la concentración de esporas, disminuye el tiempo de respuesta del método desde 12 horas ($\text{Log}[E] = 3.60$) hasta 5.2 horas ($\text{Log}[E] = 7.1$). También se observa que el tiempo de respuesta tiende a estabilizarse cuando se trabaja con elevadas concentraciones de esporas y que prácticamente no se puede disminuir por debajo de un intervalo comprendido entre 5.2 y 5.5 horas.

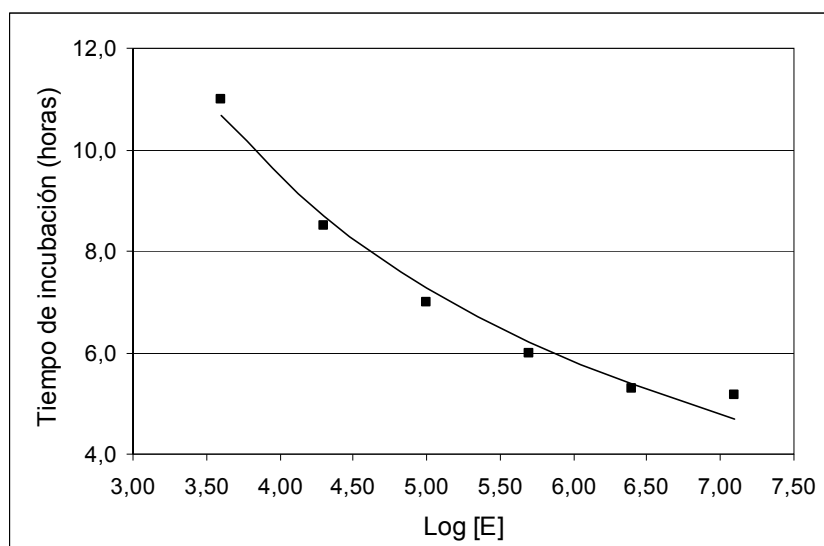


Figura IV.40. Efecto de la concentración de esporas sobre el tiempo de respuesta de Bioensayo “S” (*B. subtilis*) utilizado para la detección de sulfamidas en leche.

Debido a que los límites de detección de STZ para estos niveles de esporas son muy elevados (5400 $\mu\text{g/l}$ y 6400 $\mu\text{g/l}$ para $\text{Log}[E] = 6.40$ y $\text{Log}[E] = 7.10$, respectivamente) en comparación con su LMR (100 $\mu\text{g/l}$), en el próximo apartado se procederá a evaluar la incorporación de trimetoprim (TMP) en el medio de cultivo a fin de aproximar los LDs al valor establecido por la legislación.

IV.2.3.2. Efecto de los principales factores que afectan a la respuesta de Bioensayo “S”

En la Tabla IV.44 se resumen los resultados obtenidos luego de aplicar la opción stepwise del modelo de regresión logístico para evaluar los efectos de diversos factores de diseño sobre la curva dosis respuesta de Bioensayo “S” cuando se utiliza con muestras de leche fortificadas con sulfatiazol.

De todas las variables contempladas en el diseño factorial fraccionado, únicamente afectó en forma significativa la concentración de “TMP” en el medio de

cultivo ($\chi^2=266.603$, $p=0.0001$). Los demás factores no presentaron efectos significativos ($p>0.05$) sobre la curva dosis-respuesta del STZ.

Este hecho se puede atribuir al marcado efecto sinérgico que presenta el trimetoprim ("TMP") con STZ, llegando a ocultar totalmente a los demás factores de diseño, como por ejemplo "Log[E]" ($\chi^2= 2.6313$, $p=0.1048$). Por el contrario, en el diseño robusto aplicado a la optimización de un bioensayo para la detección de penicilina "G" en leche (apartado IV.1.1) resultaron significativos ($p<0.05$) los efectos de volumen de medio, concentración de esporas y tiempo de incubación (Tabla IV.1), entre otros factores de diseño. Sin embargo este diseño no incorporaba agentes antimicrobianos en el medio de cultivo, tales como "TMP"

Tabla IV.44. Parámetros estadísticos del diseño factorial fraccionado utilizado en la optimización de Bioensayo "S" (*B. subtilis*)

Factores	Valor " χ^2 "	Valor "p"
TMP	266.603	0.0001
Log [E]	2.6313	0.1048
Volumen medio	0.8357	0.3606
Indicadores	0.0226	0.8804
Temperatura	0.1820	0.6597

En forma similar, durante la optimización de Bioensayo "BT" (*G. stearothermophilus*) se observaron efectos significativos para "Log[E]" y concentración de "CAP" ($p<0.05$, Tabla IV.4). Hay que destacar que este antimicrobiano (CAP) no ejerce sinergismo como "TMP" con las SAs.

La siguiente ecuación matemática expresa el efecto del "TMP" en el medio de cultivo sobre la curva dosis-respuesta del STZ para el Bioensayo "S", obtenida a partir de los datos del diseño factorial fraccionado:

$$\text{Logit [P]} = -7.2489 + 0.0171*[\text{STZ}] + 0.0624*[\text{TMP}] \quad (\text{C} = 87.4 \%)$$

La Figura IV.41 permite visualizar el efecto del "TMP" sobre las curvas dosis-respuestas del STZ para el Bioensayo "S". Un incremento en el nivel de "TMP" produce un desplazamiento de la curva logística hacia la izquierda de la figura, acompañado de una disminución en el límite de detección del método.

En forma similar, este sinergismo entre “TMP” y SAs se señaló en la optimización de Bioensayo “BS”, donde se observó que la incorporación de 60 µg/l TMP, produce una disminución en el LD de sulfatiazol, desde 4360 µg/l hasta 160 µg/l.

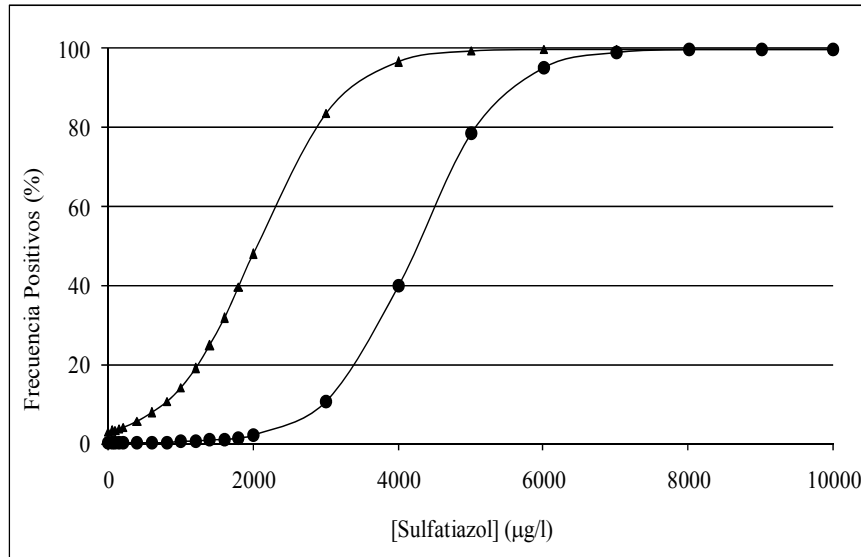


Figura IV.41. Efecto de la concentración de TMP sobre la curva dosis-respuesta de sulfatiazol en leche analizada con Bioensayo “S” (*B. subtilis*) (▲: TMP = 60 µg/l; ●: sin TMP).

Se debe destacar que un diseño factorial fraccionado (2^{5-2}) permite evaluar un número máximo de 7 factores mediante la realización de tan solo 8 unidades experimentales. Este diseño facilita únicamente el cálculo de factores principales, pero no logra estimar las interacciones entre dichos factores. Sin embargo, en el apartado IV.1.3. se demostró el sinergismo que existe entre “TMP” y las sulfamidas. Por este motivo, en el siguiente apartado se evaluó la posible acción sinérgica entre ambos antimicrobianos cuando se emplea como bacteria test *B. subtilis*.

IV.2.3.3. Optimización de Bioensayo “S” (*B. subtilis*) para la detección de sulfamidas en leche

Para la optimización de Bioensayo “S” se analizaron el efecto de diferentes niveles de trimetoprim (TMP) sobre la selectividad y los límites de detección de sulfamidas en leche, para disponer de un bioensayo que presente elevada selectividad (baja frecuencia de resultados falsos positivos) y adecuados límites de detección para las sulfamidas en leche.

IV.2.3.3.1. Estudio de selectividad de Bioensayo “S” para la detección de sulfamidas en leche

La Tabla IV.45 muestra los valores de selectividad de los bioensayos elaborados con diferentes niveles de “TMP”, así como el valor de este parámetro cuando se utiliza el método de referencia Copan® CH-ATK Test en el análisis de duplicados de 192 muestras de leche según IDF (IDF-FIL, 2002).

Tabla IV.45. Efecto de la concentración de TMP en el medio de cultivo sobre la selectividad de Bioensayo “S”

TMP (µg/l)	Número Muestras	Positivo	Negativo	Selectividad (%)
0	192	2	190	98.9
50	192	2	190	98.9
100	192	4	188	97.9
150	192	4	188	97.9
200	192	5	187	97.3
300	192	12	180	93.8
Copan CH-ATK® Test	192	8	184	95.8

TMP: trimetoprim, Selectividad=“resultados positivos/número de muestras”.

La selectividad del bioensayo elaborado con 50 µg TMP/l resultó igual a la calculada cuando los métodos se preparan sin la incorporación de TMP (98.9%), mientras que la incorporación de 100, 150 y 200 µg TMP/l producen leves disminuciones en la selectividad (97.9%, 97.9% y 97.3%, respectivamente). Por el contrario, el uso de concentraciones más elevadas (300 µg TMP/l) da lugar a mayores disminuciones en la selectividad (93.8%), acompañado de un incremento en la frecuencia de resultados “falsos positivos” o “anómalos” al método. Por este motivo, no se recomienda el empleo de 300 µg TMP/l para la elaboración de este método.

La selectividad del Bioensayo “S” fortificado con 200 µg TMP/l (97.3%) fue más elevada a la presentada por el método Copan® CH-ATK Test (95.8%).

Cuando se comparan los niveles de “TMP” utilizados en la elaboración de este bioensayo con los empleados por otros autores, cabe resaltar que, Koenen-Dierick *et al.* (1998) utilizan 200 µg/l para ensayos de difusión en placas de Petri con *B. subtilis*

como microorganismo de prueba, concentración equivalente a la utilizada en este trabajo. Por el contrario, otros autores (Okerman *et al.*, 1998, Myllyniemi *et al.*, 2001) emplean menores niveles (60 µg/l) para ensayos de difusión en placas de Petri.

IV.2.3.3.2. Efecto del trimetoprim en Bioensayo “S” sobre los límites de detección de sulfamidas en leche

- **Curvas dosis-respuesta de sulfamidas en leche de Bioensayo “S” sin TMP:** Las ecuaciones que expresan las curvas dosis-respuestas de sulfamidas en leche, obtenidas mediante el modelo logístico para el método elaborado sin la incorporación de TMP, se muestran en la Tabla IV.46

Tabla IV.46. Modelos logísticos que representan las curvas dosis-respuestas de sulfamidas para Bioensayo “S” (*B. subtilis*) sin TMP

Sulfamidas	Logit [P] = $\beta_0 + \beta_1$ [Sulfamida]	C
Sulfadiazina	Logit [P] = - 9.8656 + 0.00131 [SDZ]	95.4
Sulfadimetoxina	Logit [P] = -6.0656 + 0.00059 [SDM]	88.6
Sulfametazina	Logit [P] = -7.4874 + 0.00058 [SMZ]	87.6
Sulfametoxazol	Logit [P] = -6.4389 + 0.00100 [SMX]	93.8
Sulfatiazol	Logit [P] = -4.7726 + 0.00069 [STZ]	89.3

SDZ: sulfadiazina, SDM: sulfadimetoxina, SMZ: sulfametazina, SMX: sulfametoxazol, STZ: sulfatiazol, C: Coeficiente de concordancia porcentual.

Los valores de los coeficientes “ β_1 ” fueron bajos (comprendidos entre 0.00058 para SMZ y 0.00131 para SDZ), en comparación con los observados para los antibióticos betalactámicos detectados con Bioensayo “B” y las tetraciclinas con el Bioensayo “T”.

Los coeficientes de concordancia fueron elevados, ya que están comprendidos entre 88.6% (SDM) y 95.4% (SDZ). Las curvas dosis-respuestas para el Bioensayo “S” sin la incorporación de “TMP” se presentan en la Figura IV.42. En ellas se observa que la región en la cual se produce el cambio de respuesta del método está comprendida entre 4000 µg/l y 20000 µg/l.

Los límites de detección para las cinco sulfamidas se resumen en la Tabla IV.47. Los niveles de detección están muy alejados de sus correspondientes LMRs

(100 $\mu\text{g/l}$), motivo por el cual, se procederá a mejorar la sensibilidad de este microorganismo mediante la incorporación de “TMP” en el medio de cultivo.

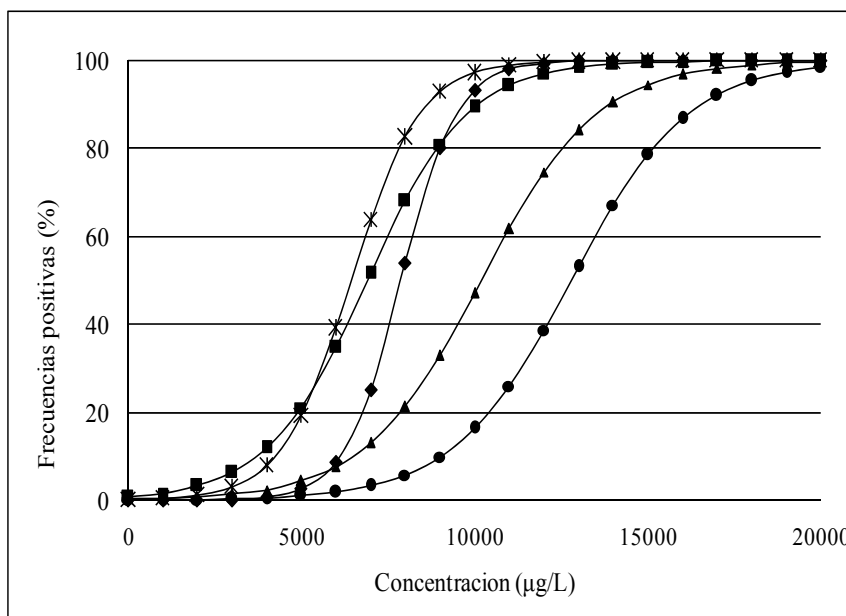


Figura IV.42. Curvas dosis-respuesta de las sulfamidas en leche para Bioensayo (*B. subtilis*) sin la adición de TMP (◆: sulfadiazina, ▲: sulfadimetoxina, ●: sulfametazina, ×: sulfametoxazol, ■: sulfatiazol).

Tabla IV.47. Límites de detección de sulfamidas en leche calculados para Bioensayo S (*B. subtilis*) sin TMP

Sulfamidas	Límite detección	LMR
Sulfadiazina	10200	100
Sulfadimetoxina	15100	100
Sulfametazina	17800	100
Sulfametoxazol	9400	100
Sulfatiazol	11000	100

Límite de detección ($\mu\text{g/l}$); LMR: Límite Máximo de Residuo ($\mu\text{g/l}$).

- Curvas dosis-respuesta de sulfamidas en leche para Bioensayo “S” con TMP:

La aplicación del modelo de regresión logística con interacción, señaló efectos significativos para las concentraciones de las cinco sulfamidas, además el efecto del “TMP” resultó significativo ($p < 0.05$) para sulfadiazina, sulfadimetoxina, sulfametoxazol y sulfatiazol, tal como se muestra en la Tabla IV.48. Por su parte, la interacción entre “TMP” y SAs fue significativa para sulfadiazina, sulfadimetoxina y sulfametazina.

Tabla IV.48. Valores de χ^2 y probabilidad de los factores contemplados en el modelo logístico para Bioensayo "S" (*B. subtilis*) utilizado para detectar sulfamidas en leche

Sulfamidas	[SAs]		[TMP]		[SAs]*[TMP]	
	Valor " χ^2 "	Valor "p"	Valor " χ^2 "	Valor "p"	Valor " χ^2 "	Valor "p"
Sulfadiazina	212.3912	0.0001	7.1811	0.0074	22.0405	0.0001
Sulfadimetoxina	387.382	0.0001	8.9143	0.0028	23.8257	0.0001
Sulfametazina	8.1811	0.0042	2.2681	0.1321	52.1359	0.0001
Sulfametoxazol	54.3501	0.0001	246.6281	0.0001	0.3211	0.5709
Sulfatiazol	799.3842	0.0001	227.4873	0.0001	2.5827	0.1096

SAs: sulfamidas, TMP: trimetoprim.

Con el propósito de visualizar el signo de cada efecto, así como su magnitud de importancia, se construyó la Tabla IV.49, donde se muestran las ecuaciones obtenidas mediante la aplicación de la opción stepwise del modelo de regresión logística y los coeficientes de concordancia para cada sulfamida.

Tabla IV.49. Modelos logísticos que representan el efecto del "TMP" sobre las curvas dosis-respuestas de las sulfamidas en leche para Bioensayo "S" (*B. subtilis*)

SAs	Logit [P] = $\beta_0 + \beta_1$ [SAs] + β_2 [TMP] + β_{12} [SAs]*[TMP]	C
SDZ	Logit [P] = -8.5518+0.0091[SDZ]+0.0191[TMP]+0.00011[SDZ]*[TMP]	88.1
SDM	Logit [P] = -10.5801+0.0095[SDM]+0.0240[TMP]+0.00011[SDM]*[TMP]	90.0
SMZ	Logit [P] = -8.8089+0.0014[SMZ] +0.000089[SMZ]*[TMP]	89.6
SMX	Logit [P] = -13.5515+0.0321[SMX]+0.0522[TMP]	90.3
STZ	Logit [P] = -16.2317+0.0249[STZ]+0.0632[TMP]	89.8

SAs: sulfamidas, TMP: trimetoprim, SDZ: sulfadiazina, SDM: sulfadimetoxina, SMZ: sulfametazina, SMX: sulfametoxazol, STZ: sulfatiazol, C: Coeficiente de concordancia porcentual.

En los cinco casos, los coeficientes " β_1 " resultaron positivos, señalando un incremento en la frecuencia de resultados positivos al método conforme aumenta la concentración de sulfamida en la leche. Respecto a su magnitud, se debe mencionar que las tres primeras sulfamidas (SDZ, SDM y SMZ) presentaron menores valores (0.0091, 0.0095 y 0.0014, respectivamente), en comparación con las otras dos sulfamidas (SMX y STZ) cuyos valores fueron más elevados (0.0321 y 0.0249,

respectivamente). Aunque, dicho parámetro se ve incrementado en las tres primeras, por el efecto de las interacciones entre sus concentraciones con el “TMP” (coeficientes “ β_{12} ”), cuyos efectos también fueron positivos ($\beta_{12, SDZ} = 0.00011$, $\beta_{12, SDM} = 0.00011$, $\beta_{12, SMZ} = 0.00089$), poniendo de manifiesto una acción sinérgica de estos fármacos frente a *B. subtilis*.

Para las otras dos sulfamidas (SMX y STZ) resultó significativo el efecto simple del TMP. En dichos casos no se observa sinergismo, sino una simple aditividad de acciones antimicrobianas, indicando un paralelismo en las curvas dosis-respuestas en la medida que se incremente la concentración de “TMP” en el medio de cultivo. Los ajustes logrados con el modelo logístico fueron buenos, con coeficientes de concordancia comprendidos entre 88.1% para SDZ y 90.3% para SMX.

El efecto del “TMP” sobre las curvas dosis-respuestas de Bioensayo “S” se visualiza en la Figura IV.43. Para las cinco sulfamidas, se observa que el incremento de la concentración de “TMP” (desde 50 $\mu\text{g/l}$ hasta 200 $\mu\text{g/l}$) produce un desplazamiento de las curvas logísticas hacia menores concentraciones de sulfamidas.

Además, en las tres primeras figuras, se debe destacar el efecto sinérgico entre cada sulfamida (SDZ, SDM y SMZ) con el “TMP” que se pone de manifiesto a través de un incremento en las pendientes de las curvas dosis-respuestas conforme aumenta la concentración de “TMP” en el medio de cultivo.

La Tabla IV.50 resume los efectos que produce la incorporación de “TMP” sobre los límites de detección de las sulfamidas calculados para Bioensayo “S” (*B. subtilis*). En todos los casos se observa una disminución en los límites de detección en la medida que se incrementa el nivel de “TMP” en el medio de cultivo.

Al igual que se observó en la optimización para sulfamidas de Bioensayo “BS”, el incremento en la concentración de “TMP” en el medio (Tabla IV.50) disminuye los límites de detección de las sulfamidas cuando se emplea Bioensayo “S” (*B. subtilis*).

Cuando se compran los límites de detección de Bioensayo “BS” que utiliza *G. stearothermophilus* (Tabla IV.12) con los obtenidos para Bioensayo “S” que emplea *B. subtilis*, se aprecia que el primer método presentó menores límites para SMZ (320 $\mu\text{g/l}$), SMX (110 $\mu\text{g/l}$) y STZ (160 $\mu\text{g/l}$) en comparación con el segundo (610 $\mu\text{g/l}$ de SMZ, 180 $\mu\text{g/l}$ de SMX y 260 $\mu\text{g/l}$ de STZ). Por el contrario, Bioensayo “S” mostró menores niveles de detección para SDM (270 $\mu\text{g/l}$) y SDZ (240 $\mu\text{g/l}$) que Bioensayo “BS” (380 $\mu\text{g/l}$ de SDM y 320 $\mu\text{g/l}$ de SDZ).

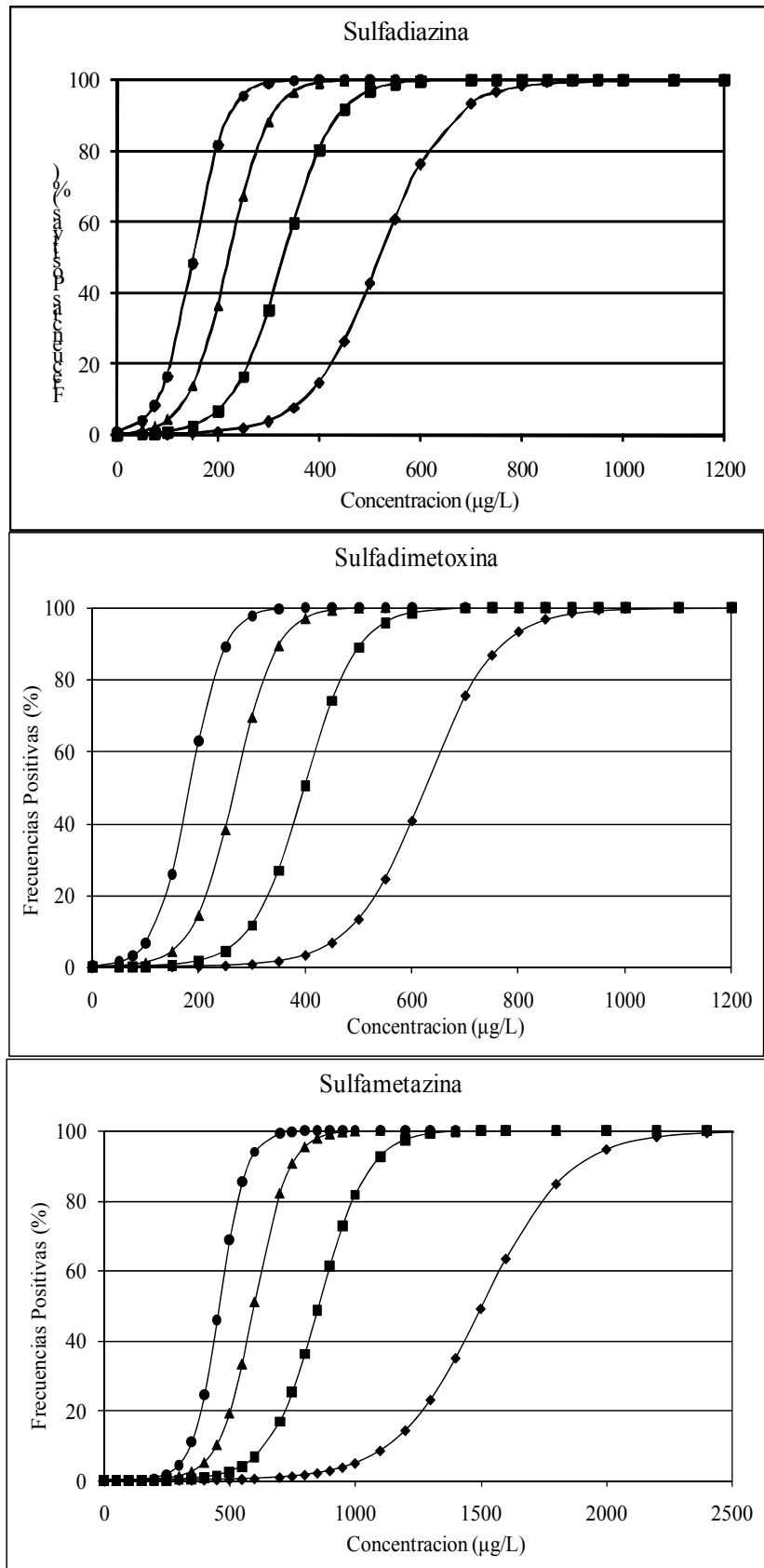


Figura IV.43. Efecto del TMP sobre las curvas dosis-respuesta de las sulfamidas en leche para Bioensayo "S" (*B. subtilis*) (♦: 50 µg TMP/l, ■: 100 µg TMP/l, ▲: 150 µg TMP/l, ●: 200 µg TMP/l).

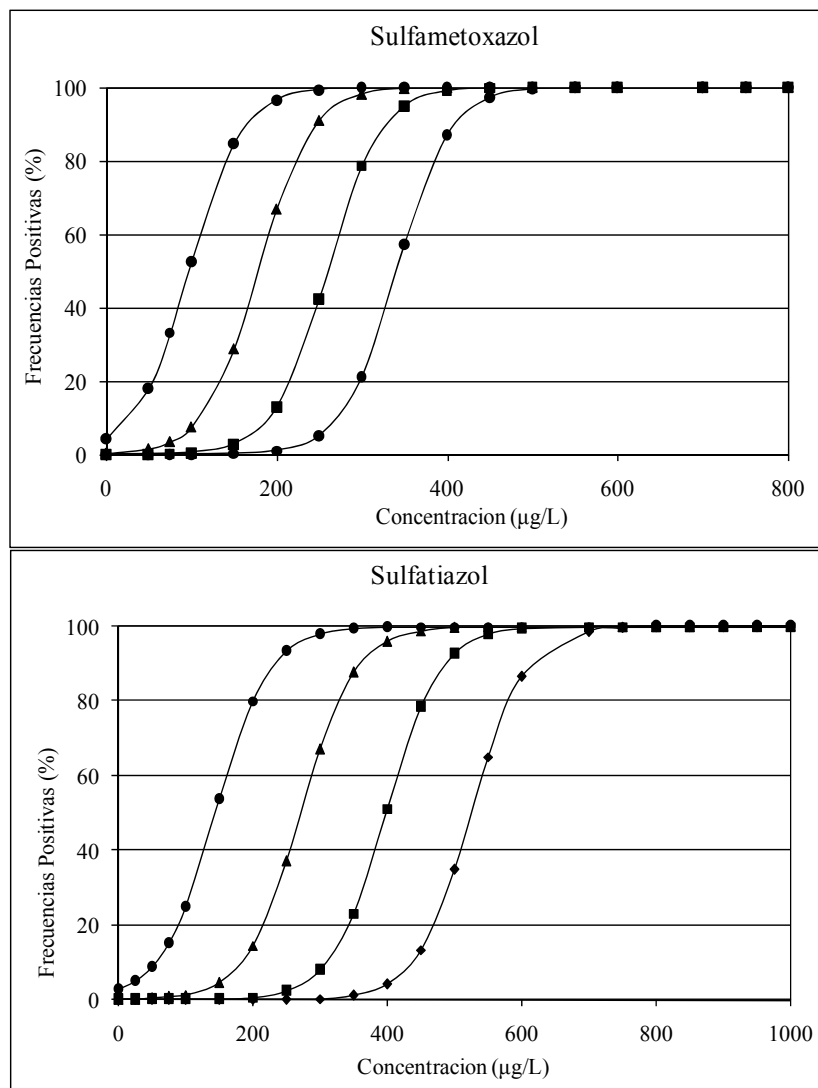


Figura IV.43 (cont). Efecto del TMP sobre las curvas dosis-respuesta de las sulfamidas en leche para Bioensayo "S" (*B. subtilis*) (♦: 50 µg TMP/l, ■: 100 µg TMP/l, ▲: 150 µg TMP/l, ●: 200 µg TMP/l).

Para el SMMP, Nouws *et al.* (1998,1999a,b) obtienen bajos niveles de detección para SDM (20 µg/l), SDZ (30 µg/l) y SMZ (40 µg/l) cuando utilizan la placa correspondiente a sulfamidas (10^4 esporas/ml de *B. subtilis* con 45 µg/l de "TMP") para un mayor tiempo de incubación (comprendido entre 18-24 horas), debido a la baja concentración de esporas utilizada.

En otros Sistemas Microbiológicos Multirresiduos, Tsai y Kondo (2001), al emplear la placa de Petri que contiene esporas de *B. subtilis* (10^6 esporas/ml, con 50 µg/l de "TMP") detectan 780 µg/l de SDM, 3120 µg/l de SDZ, 1560 µg/l de SMX y 12500 µg/l de SMZ para un tiempo de incubación de 18-24 horas a 30°C. Estos niveles

son comparables a los elevados valores obtenidos para el Bioensayo “S” fortificado con tan solo 50 µg/l de TMP (Tabla IV.48), condiciones muy alejadas a las 200 µg/l de “TMP” recomendado en este trabajo (Tabla IV.50).

Tabla IV.50. Efecto del TMP sobre los límites de detección (µg/l) de sulfamidas en leche para Bioensayo “S” (*B. subtilis*)

Sulfamidas	Concentración de TMP (µg/l)				LMR
	50	100	150	200	
Sulfadiazina	720	470	330	240	100
Sulfadimetoxina	820	540	380	270	100
Sulfametazina	2000	1140	790	610	100
Sulfametoxazol	430	350	270	180	100
Sulfatiazol	640	520	390	260	100

TMP: trimetoprim, SDZ: sulfadiazina, SDM: sulfadimetoxina, SMZ: sulfametazina, SMX: sulfametoxazol, STZ: sulfatiazol, LMR: Límite Máximo de Residuos (µg/l).

IV.2.4. RESULTADOS DE DETECCIÓN DEL SISTEMA MICROBIOLÓGICO EN MICROPLACA 2 (SMmp2)

IV.2.4.1. Límites de detección de antibióticos betalactámicos en leche con el SMmp2

La Tabla IV.51 (Bioensayo “B”), Tabla IV.52 (Bioensayo “T”) y Tabla IV.53 (Bioensayo “S”) muestran las ecuaciones que relacionan la frecuencia de resultados positivos en función de las concentraciones de antibióticos betalactámicos en leche, calculadas mediante la aplicación del modelo de regresión logístico.

Los mayores valores de los coeficientes “ β_1 ” se obtienen para Bioensayo “B” (*G. stearothermophilus*), seguido por Bioensayo “S” (*B. subtilis*), en comparación con Bioensayo “T” (*B. cereus*). Este hecho pone de manifiesto una inadecuada especificidad cruzada por parte del segundo método, ya que elevadas concentraciones de betalactámicos en la leche, pueden producir resultados positivos en Bioensayo “S”. Por el contrario, Bioensayo “T” no presentará problemas de especificidad cruzada con esta familia de antimicrobianos, debido a los bajos coeficientes “ β_1 ”.

Las penicilinas manifestaron mayores pendientes que las cefalosporinas en Bioensayos “B” y “S”, mientras que Bioensayo “T” presentó mayor sensibilidad a las cefalosporinas que a las penicilinas, aunque ambas sensibilidades son muy bajas.

Tabla IV.51. Modelos logísticos de las curvas dosis de los antibióticos betalactámicos en leche analizados con Bioensayo “B” (*G. stearothermophilus*)

Betalactámicos	Logit [P] = $\beta_0 + \beta_1$ [Betalactámico]	C
<i>Penicilinas</i>		
Amoxicilina	Logit [P] = -14.0306 + 1.2469 [AMO]	89.8
Ampicilina	Logit [P] = -24.8752 + 3.3966 [AMP]	85.2
Cloxacilina	Logit [P] = -21.5043 + 0.4986 [CLOXA]	89.9
Oxacilina	Logit [P] = -18.8011 + 0.8848 [OXA]	87.9
Penicilina “G”	Logit [P] = -20.8639 + 5.5637 [PENG]	90.9
<i>Cefalosporinas</i>		
Cefadroxil	Logit [P] = -15.8208 + 0.0906 [CXL]	88.3
Cefalexina	Logit [P] = -14.0465 + 0.0906 [CLX]	90.1
Cefoperazone	Logit [P] = -10.9050 + 0.0997 [CPZ]	89.8
Ceftiofur®	Logit [P] = -8.9988 + 0.0626 [CFR]	84.6
Cefuroxime	Logit [P] = -14.1039 + 0.1156 [CFU]	91.1

AMOX: amoxicilina, AMP: ampicilina, CLOX: cloxacilina, OXA: oxacilina, PENG: penicilina “G”, CXL: cefadroxil, CLX: cefalexina, CPZ: cefoperazone, CFR: ceftiofur, CFU: cefuroxime, C: Coeficiente de concordancia porcentual.

Tabla IV.52. Modelos logísticos de las curvas dosis de los antibióticos betalactámicos en leche analizados con Bioensayo “T” (*B. cereus*)

Betalactámicos	Logit [P] = $\beta_0 + \beta_1$ [Betalactámico]	C
<i>Penicilinas</i>		
Amoxicilina	Logit [P] = -9.8662 + 0.0001 [AMOX]	81.0
Ampicilina	Logit [P] = -7.6321 + 0.0001 [AMP]	82.0
Cloxacilina	Logit [P] = -15.0461 + 0.0010 [CLOX]	86.8
Oxacilina	Logit [P] = -11.3960 + 0.0018 [OXA]	86.5
Penicilina “G”	Logit [P] = -11.6210 + 0.0002 [PENG]	85.6
<i>Cefalosporinas</i>		
Cefadroxil	Logit [P] = -12.5184 + 0.0028 [CXL]	90.9
Cefalexina	Logit [P] = -13.2306 + 0.0020 [CLX]	87.6
Cefoperazone	Logit [P] = -13.3496 + 0.0022 [CPZ]	88.9
Ceftiofur®	Logit [P] = -13.5705 + 0.0003 [CFR]	86.0
Cefuroxime	Logit [P] = -10.4047 + 0.0009 [CFU]	87.0

AMOX: amoxicilina, AMP: ampicilina, CLOX: cloxacilina, OXA: oxacilina, PENG: penicilina “G”, CXL: cefadroxil, CLX: cefalexina, CPZ: cefoperazone, CFR: ceftiofur, CFU: cefuroxime, C: Coeficiente de concordancia porcentual.

Tabla IV.53. Modelos logísticos de las curvas dosis de los antibióticos betalactámicos en leche analizados con Bioensayo “S” (*B. subtilis*)

Betalactámicos	Logit [P] = $\beta_0 + \beta_1$ [Betalactámico]	C
<i>Penicilinas</i>		
Amoxicilina	Logit [P] = -14.9481 + 0.3368 [AMOX]	85.2
Ampicilina	Logit [P] = -8.39277 + 0.3357 [AMP]	85.6
Cloxacilina	Logit [P] = -13.5614 + 0.0775 [CLOX]	82.7
Oxacilina	Logit [P] = -12.8217 + 0.0777 [OXA]	87.9
Penicilina “G”	Logit [P] = -10.9682 + 2.0317 [PENG]	88.4
<i>Cefalosporinas</i>		
Cefadroxil	Logit [P] = -7.98232 + 0.0091 [CXL]	86.3
Cefalexina	Logit [P] = -7.59857 + 0.0173 [CLX]	90.0
Cefoperazone	Logit [P] = -13.6332 + 0.0314 [CPZ]	86.4
Ceftiofur®	Logit [P] = -5.49527 + 0.0244 [CFR]	80.2
Cefuroxime	Logit [P] = -7.6362 + 0.0235 [CFU]	89.1

AMOX: amoxicilina, AMP: ampicilina, CLOX: cloxacilina, OXA: oxacilina, PENG: penicilina “G”, CXL: cefadroxil, CLX: cefalexina, CPZ: cefoperazone, CFR: ceftiofur, CFU: cefuroxime, C: Coeficiente de concordancia porcentual.

De todos los betalactámicos analizados con Bioensayo “B”, penicilina “G” ($\beta_1 = 5.5637$) mostró mayor coeficiente “ β_1 ”, seguido de ampicilina ($\beta_1 = 3.3966$), amoxicilina ($\beta_1 = 1.2469$), oxacilina ($\beta_1 = 0.8848$), cloxacilina ($\beta_1 = 0.4986$) y en menor medida las cefalosporinas. Por su parte, el Bioensayo “S” tiende a mantener el mismo orden de los coeficientes “ β_1 ” de las penicilinas que el Bioensayo “B”, mostrando a su vez, menor sensibilidad para las cefalosporinas.

Con respecto a los coeficientes de concordancia, fueron adecuados ya que se hallan comprendidos entre 80.2% para ceftiofur® (Bioensayo “S”) y 91.1% para cefuroxime (Bioensayo “B”).

Las siguientes figuras permiten visualizar el efecto de las concentraciones de penicilinas y cefalosporinas en leche sobre las frecuencias relativas de respuestas positivas al Bioensayo “B” (Figura IV.44 y Figura IV.45), Bioensayo “T” (Figura IV.46 y Figura IV.47) y Bioensayo “S” (Figura IV.48 y Figura IV.49).

El comportamiento de *G. stearothermophilus* sin la incorporación de “CAP” (Bioensayo “BT”) o “TMP” (Bioensayo “BS”) resultó similar al observado para el Bioensayo “B”, ya que presenta curvas dosis-respuestas que crecen rápidamente con el incremento de los niveles de penicilina en leche y un crecimiento más suave para las cefalosporinas.

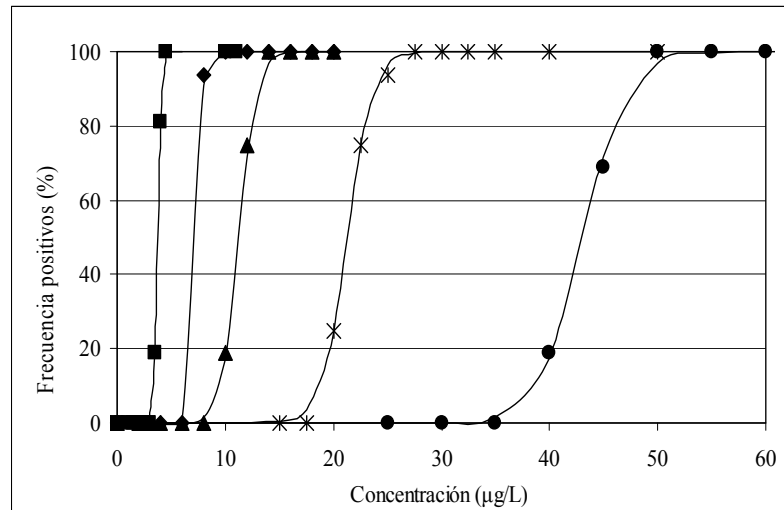


Figura IV.44. Curvas dosis respuestas de penicilinas en leche analizadas con Bioensayo “B” (▲: amoxicilina, ◆: ampicilina, ●: cloxacilina, x: oxacilina, ■: penicilina “G”).

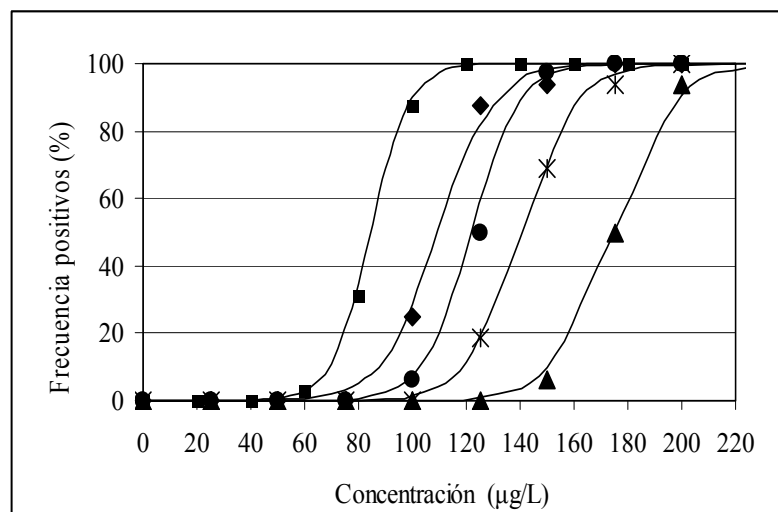


Figura IV.45. Curvas dosis respuestas de cefalosporinas de leche analizadas con Bioensayo “B” (▲: cefadroxil, x: cefalexina, ◆: cefoperazone, ■: ceftiofur®, ●: cefuroxime).

Las Figura IV.46 y Figura IV.47, construidas para el Bioensayo “T”, muestran que *B. cereus* posee mayor sensibilidad para detectar residuos de cloxacilina, oxacilina y cefalosporinas (a excepción de ceftiofur®) en leche, que el resto de las penicilina estudiadas. Sin embargo, para obtener resultados positivos a este método, deben efectuarse grandes incrementos en sus concentraciones (bajos coeficientes “ β_1 ”, Tabla IV.52) en comparación con los observados para Bioensayo “B” (elevados coeficientes “ β_1 ”, Tabla IV.51), poniendo de manifiesto la baja sensibilidad de *B. cereus* para detectar antibióticos betalactámicos.

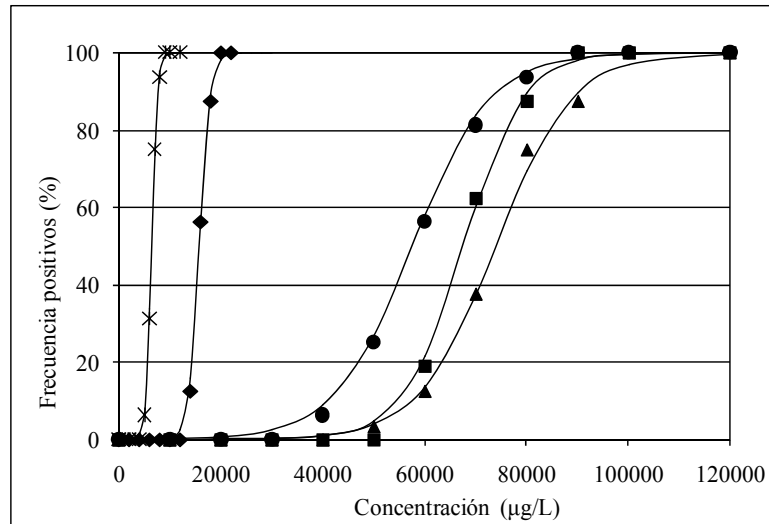


Figura IV.46. Curvas dosis respuestas de penicilinas en leche analizadas con Bioensayo "T" (▲: amoxicilina, ◆: ampicilina, ●: cloxacilina, x: oxacilina, ■: penicilina "G").

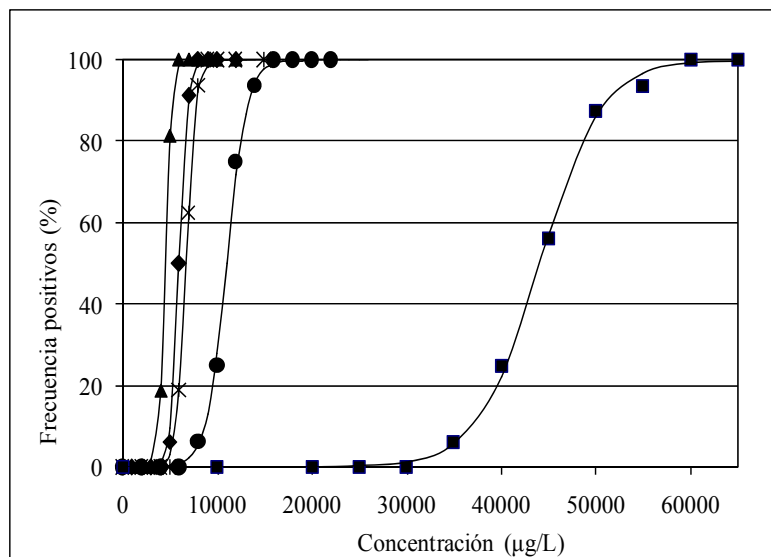


Figura IV.47. Curvas dosis respuestas de cefalosporinas de leche analizadas con Bioensayo "T" (▲: cefadroxil, x: cefalexina, ◆: cefoperazone, ■: ceftiofur®, ●: cefuroxime).

Con respecto a *B. subtilis* (Bioensayo "S"), las curvas dosis respuesta presentaron un menor valor de la pendiente " β_1 " a los observados para *G. stearothermophilus*, pero superiores a los que presenta *B. cereus*. En efecto, niveles de 10 µg/l de penicilina "G", 20 µg/l de ampicilina, 60 µg/l de amoxicilina, 240 µg/l de cloxacilina u oxacilina, o 400 µg/l y 600 µg/l de cefalosporinas producen el 100% de resultados positivos al método (Figura IV.48 y Figura IV.49).

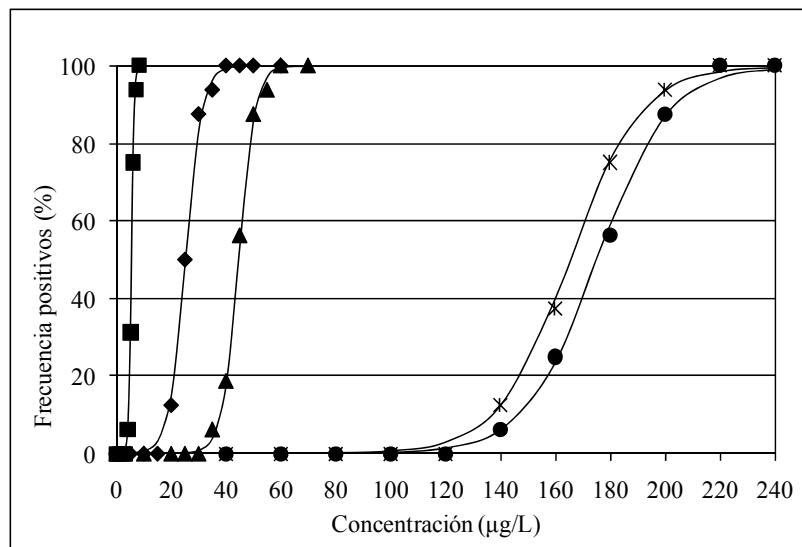


Figura IV.48. Curvas dosis respuestas de penicilinas en leche analizadas con Bioensayo “S” (▲: amoxicilina, ◆: ampicilina, ●: cloxacilina, x: oxacilina, ■: penicilina “G”).

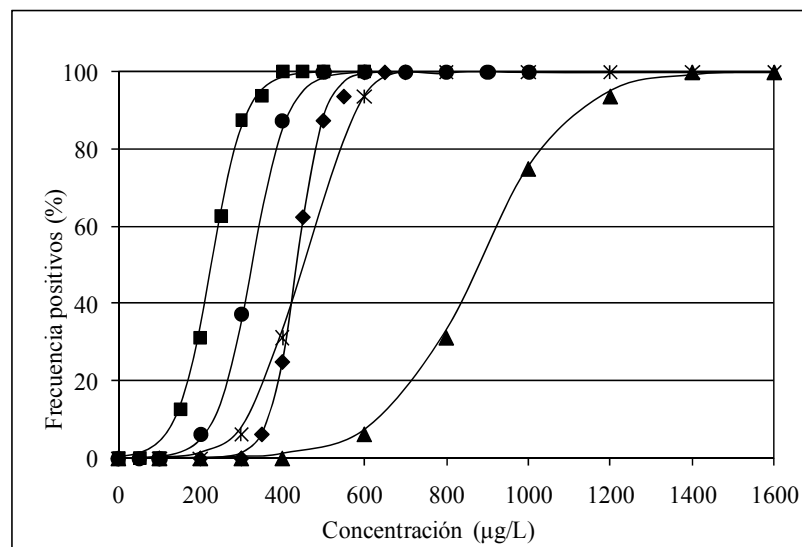


Figura IV.49. Curvas dosis respuestas de cefalosporinas de leche analizadas con Bioensayo “S” (▲: cefadroxil, x: cefalexina, ◆: cefoperazone, ■: ceftiofur[®], ●: cefuroxime).

Los límites de detección de los antibióticos betalactámicos para Bioensayos “B”, “T” y “S” se resumen en la Tabla IV. 54. De los tres métodos estudiados, Bioensayo “B” presenta mejores límites de detección para antimicrobianos pertenecientes a esta familia, por estar próximos a sus LMRs.

Tabla IV.54. Límites de detección de antibióticos betalactámicos en leche para el SMmp2

Betalactámicos	Límites de detección			LMR
	Bioensayo "B"	Bioensayo "T"	Bioensayo "S"	
<i>Penicilinas</i>				
Amoxicilina	14	96000	53	4
Ampicilina	8	80000	34	4
Cloxacilina	49	19000	210	30
Oxacilina	25	8000	200	30
Penicilina "G"	4	85000	7	4
<i>Cefalosporinas</i>				
Cefadroxil	207	5600	1200	-
Cefalexina	170	8300	610	100
Cefoperazone	139	7300	530	50
Ceftiofur®	191	54000	350	100
Cefuroxime	147	14000	450	-

Límites de detección ($\mu\text{g/l}$); LMR: Límite Máximo de Residuos ($\mu\text{g/l}$).

En general, los límites de detección de Bioensayo "B" (Tabla IV.54) son más elevados que los correspondientes a Bioensayos "BT" (Tabla IV.14) y "BS" (Tabla IV.20), debido a que este método no contiene sustancias que potencian la capacidad de detección de antimicrobianos en el medio de cultivo, como "CAP" o "TMP".

En la placa específica de betalactámicos (*G. stearothermophilus*) del SMMP propuesto por Nouws *et al.* (1999a,b) se logra detectar 2 $\mu\text{g/l}$ de penicilina "G", 3 $\mu\text{g/l}$ amoxicilina, 2 $\mu\text{g/l}$ de ampicilina, 15 $\mu\text{g/l}$ de cloxacilina, 20 $\mu\text{g/l}$ de oxacilina, 30 $\mu\text{g/l}$ de ceftiofur®, 45 $\mu\text{g/l}$ de cefalexina, 30 $\mu\text{g/l}$ de cefoperazone y 45 $\mu\text{g/l}$ de cefuroxime, valores inferiores a los obtenidos para Bioensayo "B", aunque la placa propuesta por dichos autores demanda un tiempo de 6 horas de incubación a 55°C en medir los halos inhibitorios, debido a que emplea una menor concentración de esporas que en este trabajo (10⁵ esporas/ml vs 10⁷ esporas/ml).

Tsai y Kondo (2001) en la placa correspondiente a antibióticos betalactámicos (*G. stearothermophilus*) de un SMMP, mide halos inhibitorios cuando analiza muestras de leche que contienen 6 $\mu\text{g/l}$ de penicilina "G" para un tiempo de incubación de 18 horas a 55°C.

Para otro sistema microbiológico, Gaudin *et al.* (2004) detectan halos inhibitorios para 12-16 $\mu\text{g/l}$ de penicilina “G”, 5-6 $\mu\text{g/l}$ de ampicilina, 16 $\mu\text{g/l}$ de amoxicilina, 50 $\mu\text{g/l}$ de cloxacilina, 30 $\mu\text{g/l}$ de oxacilina, 125 $\mu\text{g/l}$ de ceftiofur[®], 80 $\mu\text{g/l}$ de cefoperazone y 30 $\mu\text{g/l}$ de cefalexina en muestras de leche cuando emplean la placa de *G. stearothermophilus* (5×10^5 esporas/ml, con 50 $\mu\text{g/l}$ de “TMP”) a las 12 horas de incubación a 55°C. En general, los límites de las penicilinas calculados en este trabajo fueron similares a los publicados por estos autores (a excepción de penicilina “G”), mientras que las cefalosporinas mostraron niveles más elevados a los señalados por Gaudin *et al.* (2004).

Sin embargo, se debe mencionar que, la incorporación de “TMP” en el medio de cultivo trae aparejado una disminución en los límites de detección de las sulfamidadas, acompañado de una especificidad cruzada de estos antimicrobianos en la placa específica de betalactámicos. Este hecho limita notablemente su implementación en un sistema microbiológico para la identificación de antibióticos.

Por su parte, se puede apreciar en la Tabla IV.54 que Bioensayo “T” (*B. cereus*) detecta elevadas concentraciones de antibióticos betalactámicos en leche (comprendidos entre 5600 $\mu\text{g/l}$ para cefadroxil y 96000 $\mu\text{g/l}$ para amoxicilina).

Nouws *et al.* (1999a,b), en el estudio de especificidad cruzada de la placa específica para tetraciclinas (10^5 esporas/ml de *B. cereus* y 500 $\mu\text{g/l}$ de CAP”) no observan halos inhibitorios cuando analizan muestras de leche que contienen 30 $\mu\text{g/l}$ de penicilina “G”, 30 $\mu\text{g/l}$ de ampicilina, 100 $\mu\text{g/l}$ de cloxacilina y 100 $\mu\text{g/l}$ de cefalexina.

Althaus *et al.* (2009), al evaluar la placa de tetraciclinas (*B. cereus*) del SMMP con muestras de leche de oveja enriquecidas con 40 veces los LMRs, no logran medir halos inhibitorios para 160 $\mu\text{g/l}$ de penicilina “G”, 160 $\mu\text{g/l}$ de amoxicilina, 1200 $\mu\text{g/l}$ de cloxacilina, 1200 $\mu\text{g/l}$ de oxacilina, 4000 $\mu\text{g/l}$ de cefalexina y 2000 $\mu\text{g/l}$ de cefoperazone, destacando que estos antibióticos no presentan especificidad cruzada con *B. cereus*. Estos trabajos que emplean el mismo microorganismo para la detección de residuos de tetraciclina, demuestran la ausencia de interferencias por parte de los betalactámicos.

Con respecto a Bioensayo “S” (*B. subtilis*), se debe resaltar que los límites de detección de los antibióticos betalactámicos son superiores a sus LMRs, no obstante elevadas concentraciones podrían acusar resultados positivos al método y problemas de especificidad cruzada.

Al respecto, Nouws *et al.* (1999a,b) señalan interferencias para 30 µg/l de penicilina “G”, 30 µg/l de ampicilina, 100 µg/l de cefalexina y 100 µg/l de cloxacilina en leche cuando utilizan la placa que contiene *B subtilis* en el SMMP. En forma similar Tsai y Kondo (2001) indican especificada cruzada para muestras de leche que contienen 12 µg/l de penicilina “G” cuando emplean el mismo microorganismo de prueba (*B. subtilis*).

A modo de síntesis, se puede establecer que concentraciones comprendidas entre 2 y 10 veces los LMRs de penicilinas en leche producen interferencias en Bioensayo “S”. Esta falta de especificidad de *B subtilis* debería clarificarse mediante otras pruebas complementarias, como por ejemplo el uso de penicilinas (Vermunt *et al.*, 1993) o el empleo otros microorganismos sensibles a la sulfamidas, como por ejemplo *B. megaterium* (Gudding 1976, Dey *et al.*, 2005_{a,b}) o *B. pumilus* (Pikkemaat *et al.*, 2008, 2009).

IV.2.4.2. Límites de detección de tetraciclinas en leche con el SMmp2

Las ecuaciones logísticas que expresan el efecto de las concentraciones de tetraciclinas en muestras de leche sobre las respuestas de Bioensayos “B”, “T” y “S” se resumen en Tabla IV.55, Tabla IV.56 y Tabla IV.57, respectivamente.

Tabla IV.55. Modelos logísticos de las curvas dosis-respuestas de tetraciclinas en leche analizados con Bioensayo “B” (*G. stearothermophilus*)

Tetraciclinas	Logit [P] = $\beta_0 + \beta_1$ [Tetraciclina]	C
Clortetraciclina	Logit [P] = -2.8638 + 0.0018 [CTC]	82.0
Oxitetraciclina	Logit [P] = -3.4785 + 0.0065 [OTC]	80.8
Tetraciclina	Logit [P] = -3.3424 + 0.0069 [TC]	89.3

CTC: clortetraciclina. OTC: oxitetraciclina. TC: tetraciclina, C: Coeficiente de concordancia porcentual.

Tabla IV.56. Modelos logísticos de las curvas dosis-respuestas de tetraciclinas en leche analizados con Bioensayo “T” (*B. cereus*)

Tetraciclinas	Logit [P] = $\beta_0 + \beta_1$ [Tetraciclina]	C
Clortetraciclina	Logit [P] = -15.3003 + 0.0556 [CTC]	91.0
Oxitetraciclina	Logit [P] = -7.5765 + 0.0947 [OTC]	86.6
Tetraciclina	Logit [P]= -11.5338 + 0.124655 [TC]	86.6

CTC: clortetraciclina. OTC: oxitetraciclina. TC: tetraciclina, C: Coeficiente de concordancia porcentual.

Se observa que las tetraciclinas presentan mayores valores de los coeficientes “ β_1 ” para Bioensayo “T” en comparación con los otros dos métodos, señalando una mayor sensibilidad de *B. cereus* para la detección de estos residuos en leche.

Tabla IV.57. Modelos logísticos de las curvas dosis-respuestas de tetraciclinas en leche analizados con Bioensayo “S” (*B. subtilis*)

Tetraciclinas	Logit [P] = $\beta_0 + \beta_1$ [Tetraciclina]	C
Clortetraciclina	Logit [P] = -9.19262 + 0.0289 [CTC]	86.1
Oxitetraciclina	Logit [P] = -7.33456 + 0.0391 [OTC]	86.8
Tetraciclina	Logit [P] = -7.4861 + 0.0244 [TC]	89.3

CTC: clortetraciclina. OTC: oxitetraciclina. TC: tetraciclina, C: Coeficiente de concordancia porcentual.

Los ajustes alcanzados mediante la implementación del modelo logístico, fueron adecuados, con coeficientes de concordancia comprendidos entre 80.8% para la oxitetraciclina (Bioensayo “B”) y 91.0% para la clortetraciclina (Bioensayo “T”).

Figura IV.50 (Bioensayo “B”), Figura IV.51 (Bioensayo “T”) y Figura IV.52 (Bioensayo “S”) contribuyen a visualizar los efectos de las concentraciones de las tetraciclinas sobre la respuesta de los métodos. Incrementos comprendidos entre 50 $\mu\text{g/l}$ y 100 $\mu\text{g/l}$ de oxitetraciclina y tetraciclina producen un 100% de resultados positivos a Bioensayo “T”, mientras que clortetraciclina debe estar presente en 350 $\mu\text{g/l}$ (aproximadamente) para producir resultados positivos.

Con respecto a Bioensayo “B”, se requieren mayores concentraciones de oxitetraciclina (2000 $\mu\text{g/l}$), tetraciclina (1500 $\mu\text{g/l}$) y clortetraciclina (10000 $\mu\text{g/l}$) para obtener el 100% de respuestas positivas, mientras que Bioensayo “S” requiere de concentraciones intermedias a los otros dos métodos (300 $\mu\text{g/l}$ de oxitetraciclina, 500 $\mu\text{g/l}$ de clortetraciclina y 500 $\mu\text{g/l}$ de tetraciclina) para manifestar un cambio nítido en su respuesta. Al igual que se mencionó en el estudio de especificidad cruzada de antibióticos betalactámicos, Bioensayo “S” presenta cierta interferencia con los residuos de tetraciclinas en leche.

Los límites de detección de las tres tetraciclinas, calculados para SMmp2 se resumen en la Tabla IV.58.

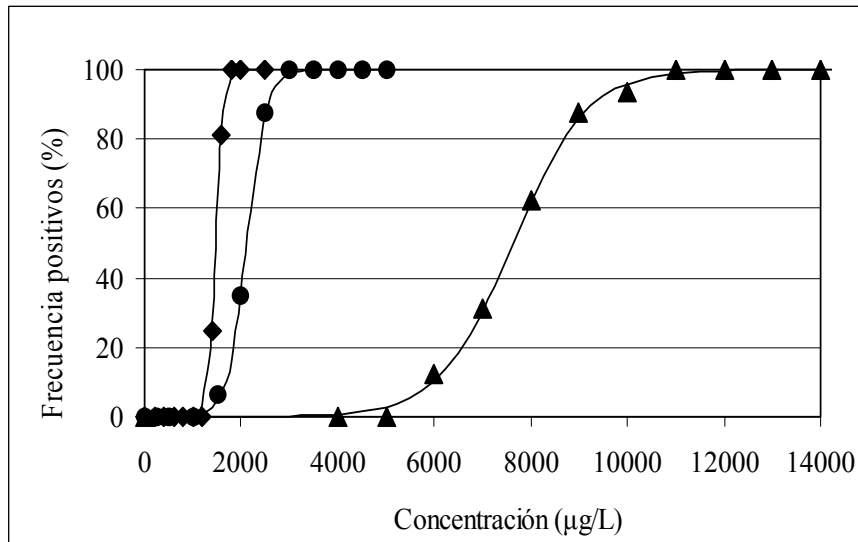


Figura IV.50. Curvas dosis-respuesta de tetraciclinas en leche analizadas con Bioensayo "B" (▲: clortetracilina, ●: oxitetracilina, ◆: tetraciclina).

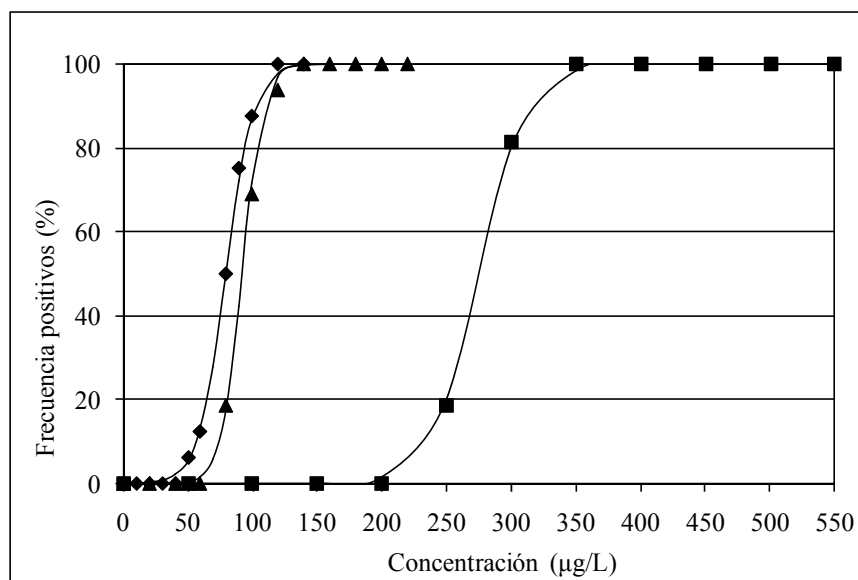


Figura IV.51. Curvas dosis-respuesta de tetraciclinas en leche analizadas con Bioensayo "T" (■: clortetracilina, ◆: oxitetracilina, ▲: tetraciclina).

La oxitetraciclina y tetraciclina son detectadas a niveles similares a sus LMRs por el Bioensayo "T", mientras que clortetracilina debe estar presente a una concentración aproximadamente tres veces su LMR. Además, el Bioensayo "S" presenta límites de detección algo bajos para las tres tetraciclinas, poniendo de manifiesto una especificidad cruzada hacia las TCs en la placa de sulfamidas. Al respecto, es de destacar que, Tsai y Kondo (2001) utilizan *B. subtilis* como bacteria test específica para la detección de tetraciclinas en su SMMP, llegando a detectar 780

$\mu\text{g/l}$ de clortetraciclina y $200 \mu\text{g/l}$ de oxitetraciclina en leche, niveles similares a Bioensayo "S" (Tabla IV.56)

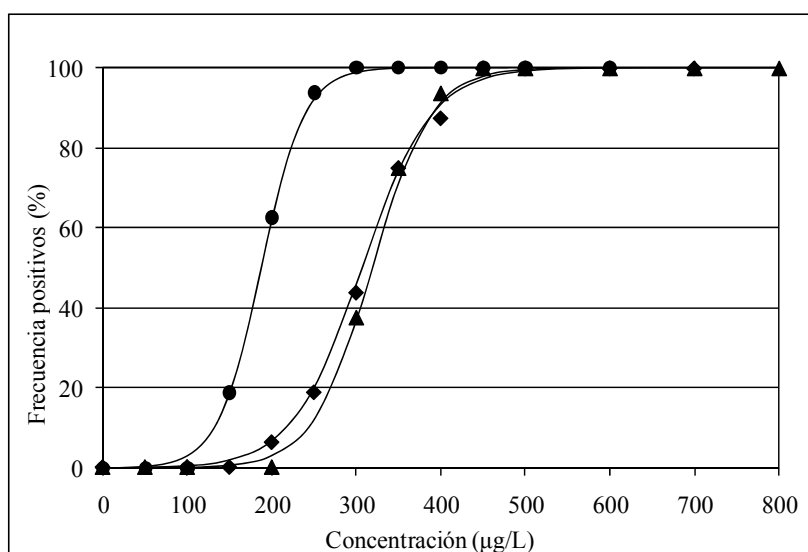


Figura IV.52. Curvas dosis-respuesta de tetraciclinas en leche analizadas con Bioensayo "S" (\blacktriangle : clortetraciclina, \bullet : oxitetraciclina, \blacklozenge : tetraciclina).

Tabla IV.58. Límites de detección de tetraciclinas en leche para el SMmp2

Tetraciclina	Límites de detección			LMR
	Bioensayo "B"	Bioensayo "T"	Bioensayo "S"	
Clortetraciclina	3200	328	420	100
Oxitetraciclina	990	106	260	100
Tetraciclina	910	111	430	100

Límites de detección ($\mu\text{g/l}$); LMR: Límite Máximo de Residuos ($\mu\text{g/l}$).

A diferencia de esta microplaca, las TCs deben estar presentes a concentraciones muy elevadas para ocasionar interferencias con Bioensayo "B" (9 a 30 veces sus LMRs, Tabla IV.58), debido a la adecuada optimización alcanzada mediante las técnicas de diseño experimental y la implementación simultánea de la función deseabilidad.

Respecto a otros SMMP, Nouws *et al.* (1999a,b) detectan $30 \mu\text{g/l}$ de oxitetraciclina y $30 \mu\text{g/l}$ de tetraciclina en leche cuando utilizan placas de Petri que contienen *B. cereus* con tiempos de incubación de 18-24 horas. Sin embargo, dichos autores no observan interferencias cuando analizan muestras de leche que contienen $500 \mu\text{g/l}$ de tetraciclinas con las placas de *B. subtilis* y *G. stearothermophilus*.

Por su parte, Gaudin *et al.* (2004) detectan 200-250 $\mu\text{g/l}$ de tetraciclina, 200-250 $\mu\text{g/l}$ de oxitetraciclina y 50 $\mu\text{g/l}$ de clortetraciclina en la placa de Petri específica para estos antimicrobianos que utiliza *B. cereus*, pero no realizan estudios de especificidad cruzada en la placa de *B. subtilis* empleada para la detección de aminoglucósidos.

Cuando el SMMP se utiliza con muestras de leche de ovejas, Althaus *et al.* (2009) miden halos inhibitorios con muestras enriquecidas con 100 $\mu\text{g/l}$ de tetraciclina, 200 $\mu\text{g/l}$ de oxitetraciclina y 250 $\mu\text{g/l}$ de clortetraciclina, en la placa de betalactámicos (*G. stearothermophilus*). En forma similar, oxitetraciclina y tetraciclina deben estar presentes a niveles de 800 $\mu\text{g/l}$ para producir interferencias en la placa de sulfamidas (*B. subtilis*).

IV.2.4.3. Límites de detección de sulfamidas en leche con el SMmp2

La Tabla IV.59 (Bioensayo “B”), Tabla IV.60 (Bioensayo “T”) y Tabla IV.61 (Bioensayo “S”) muestran los resultados obtenidos luego de aplicar el modelo de regresión logística a las frecuencias de respuestas positivas a los métodos como una función de las concentraciones de las cinco sulfamidas estudiadas.

Tabla IV.59. Modelos logísticos de las curvas dosis-respuestas de sulfamidas en leche analizados con Bioensayo “B” (*G. stearothermophilus*)

Sulfamidas	Logit [P] = $\beta_0 + \beta_1$ [Sulfamidas]	C
Sulfadiazina	Logit [P] = -8.7557 + 0.0006 [SDZ]	88.5
Sulfadimetoxina	Logit [P] = -9.8909 + 0.0013 [SDM]	77.1
Sulfametazina	Logit [P] = -6.0637 + 0.0003 [SMZ]	86.7
Sulfametoxazol	Logit [P] = -10.0570 + 0.0027 [SMX]	88.3
Sulfatiazol	Logit [P] = -11.5741 + 0.0031 [STZ]	89.5

SDZ: sulfadiazina. SDM: sulfadimetoxina. SMZ: sulfametazina. SMX: sulfametoxazol. STZ: sulfatiazol. C: Coeficiente de concordancia porcentual.

De los tres métodos diseñados, Bioensayo “S” presentó mayores valores de los coeficientes “ β_1 ”, comprendidos entre 0.0195 (sulfametazina) y 0.0392 (sulfametoxazol). Por el contrario, los valores de los coeficientes “ β_1 ” de las sulfamidas para los otros dos métodos son de un orden de magnitud inferior para Bioensayo “B” y dos ordenes de magnitud menores para Bioensayo “T”. Esta gran diferencia en los

valores de los coeficientes " β_1 " permite adelantar que no habrá especificidad cruzada de las sulfamidas con Bioensayos "B" y "T".

Tabla IV.60. Modelos logísticos de las curvas dosis-respuestas de sulfamidas en leche analizados con Bioensayo "T" (*B. cereus*)

Sulfamidas	Logit [P] = $\beta_0 + \beta_1$ [Sulfamidas]	C
Sulfadiazina	Logit [P] = -13.4200 + 0.0002 [SDZ]	94.6
Sulfadimetoxina	Logit [P] = -6.4093 + 0.0001 [SDM]	91.2
Sulfametazina	Logit [P] = -13.5391 + 0.0002 [SMZ]	92.2
Sulfametoxazol	Logit [P] = -8.2383 + 0.0002 [SMX]	92.6
Sulfatiazol	Logit [P] = -16.5965 + 0.0002 [STZ]	93.8

SDZ: sulfadiazina. SDM: sulfadimetoxina. SMZ: sulfametazina. SMX: sulfametoxazol. STZ: sulfatiazol. C: Coeficiente de concordancia porcentual.

Tabla IV.61. Modelos logísticos de las curvas dosis-respuestas de sulfamidas en leche analizados con el Bioensayo "S" (*B. subtilis*)

Sulfamidas	Logit [P] = $\beta_0 + \beta_1$ [Sulfamidas]	C
Sulfadiazina	Logit [P] = -5.475 + 0.0351 [SDZ]	88.5
Sulfadimetoxina	Logit [P] = -6.596 + 0.0352 [SDM]	77.2
Sulfametazina	Logit [P] = -8.154 + 0.0195 [SMZ]	86.7
Sulfametoxazol	Logit [P] = -4.488 + 0.0392 [SMX]	88.3
Sulfatiazol	Logit [P] = -6.271 + 0.0363 [STZ]	89.5

SDZ: sulfadiazina. SDM: sulfadimetoxina. SMZ: sulfametazina. SMX: sulfametoxazol. STZ: sulfatiazol. C: Coeficiente de concordancia porcentual.

Al igual que en los casos anteriores, los coeficientes de concordancia fueron buenos, ya que están comprendidos entre 77.1% (sulfadimetoxina, Bioensayo "B") y 94.6% (sulfadiazina, Bioensayo "T").

El efecto de las concentraciones de sulfamidas en leche sobre la frecuencia relativa de respuestas positivas a Bioensayos "B", "T" y "S" se muestra en las Figura IV.53, Figura IV.54 y Figura IV.55, respectivamente.

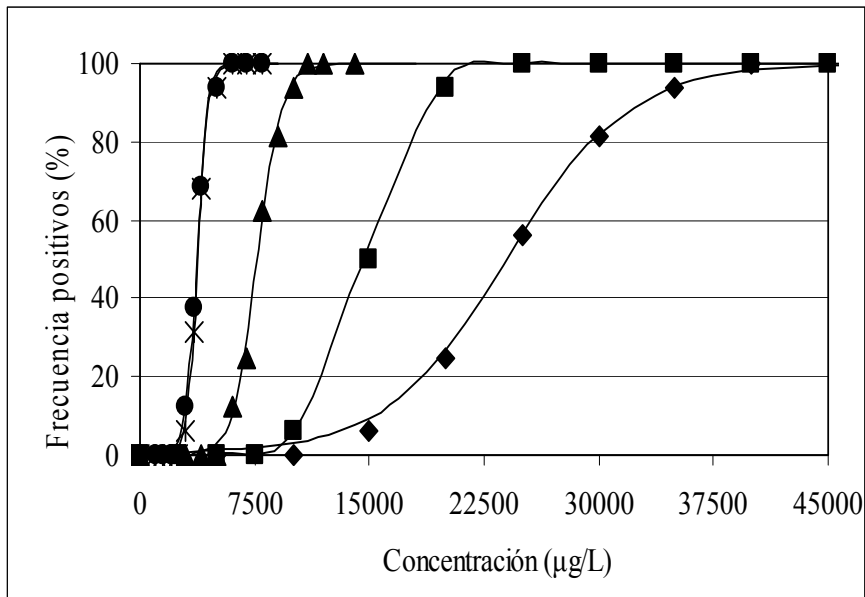


Figura IV.53. Curvas dosis-respuesta de las sulfamidas en leche analizadas por Bioensayo "B" (■: sulfadiazina, ▲: sulfadimetoxina, ◆: sulfametazina, ●: sulfametoxazol, x: sulfatiazol).

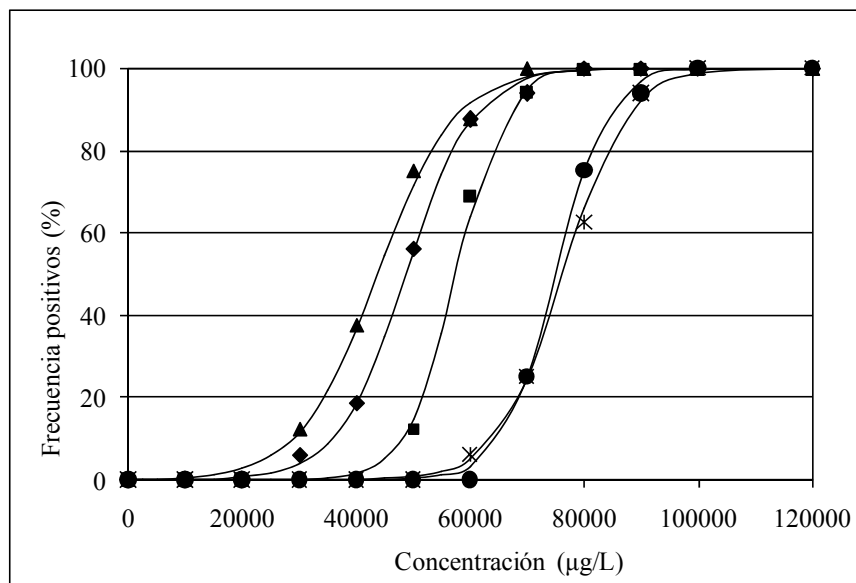


Figura IV.54. Curvas dosis-respuesta de las sulfamidas en leche analizadas por Bioensayo "T" (■: sulfadiazina, ▲: sulfadimetoxina, ◆: sulfametazina, ●: sulfametoxazol, x: sulfatiazol).

De las tres gráficas construidas se desprende que, cuando se emplea el Bioensayo "S" que contiene esporas de *B. subtilis*, se requieren pequeños incrementos (desde 50 µg/l hasta 200 µg/l) en los niveles de sulfamidas en leche, para producir un 100% de resultados positivos (a excepción de sulfametazina que debe estar presente a una concentración de 700 µg/l).

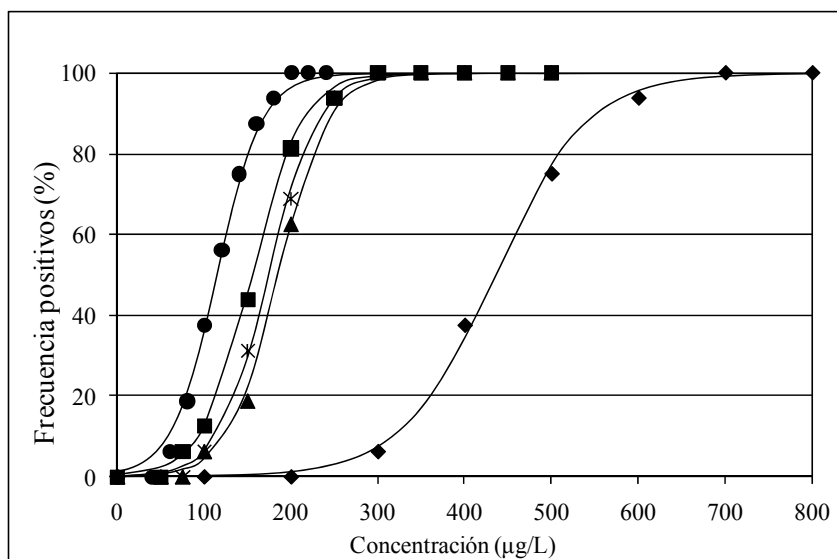


Figura IV.55. Curvas dosis-respuesta de las sulfamidas en leche analizadas con Bioensayo “S” (■: sulfadiazina, ▲: sulfadimetoxina, ◆: sulfametazina, ●: sulfametoxazol, x: sulfatiazol).

Por el contrario, los Bioensayos “B” y “T” necesitan de elevadas concentraciones de sulfamidas para obtener un 100% de resultados positivos. Así, por ejemplo, al utilizar Bioensayo “B”, sulfametoxazol o sulfatiazol deben estar presentes en la leche a una concentración de 5000 µg/l y sulfadiazina a un nivel de 45000 µg/l para producir el viraje del color negro a amarillo del método.

Los límites de detección calculados mediante el modelo de regresión logística para las cinco sulfamidas analizadas mediante el SMmp2 se resumen en Tabla IV.62. Según la optimización de Bioensayo “S”, la incorporación de 200 µg/l permite detectar niveles de sulfamidas en leche a un nivel cercano a su LMR (100 µg/l) para todas las sulfamidas, a excepción de sulfametazina que presenta un límite de detección superior (591 µg/l).

Por su parte, los límites de detección de todas las sulfamidas evaluadas con Bioensayos “B” y “T” son muy elevados (comprendidos entre 4800 µg/l para sulfametoxazol con el Bioensayo “B” y 93000 µg/l para sulfametazina con el Bioensayo “T”). Estos elevados niveles de detección ponen de manifiesto la ausencia de interferencias por parte de estos dos métodos con el Bioensayo “S” para los residuos de sulfamidas en leche.

El estudio de especificidad cruzada realizado por Nouws *et al.* (1999a,b) en el SMMP, no muestra halos inhibitorios al utiliza 500 µg/l de sulfamidas en la placa de Petri que contienen *G. stearothermophilus* y *B. cereus*.

Tabla IV.62. Límites de detección de sulfamidas el leche para el SMmp2

Sulfamida	Límites de detección			LMR
	Bioensayo "B"	Bioensayo "T"	Bioensayo "S"	
Sulfadiazina	19700	70000	239	100
Sulfadimetoxina	9900	64000	269	100
Sulfametazina	35600	93000	591	100
Sulfametoxazol	4800	66000	191	100
Sulfatiazol	4700	88000	256	100

Límites de detección ($\mu\text{g/l}$); LMR: Límite Máximo de Residuos ($\mu\text{g/l}$).

Tsai y Kondo (2001) al emplear otro SMMP, tampoco logran observar inconvenientes de especificidad cruzada en la placa de antibióticos betalactámicos (*G. stearothermophilus*), ya que los residuos de sulfadimetoxina, sulfametazina, sulfadiazina y sulfametoxazol deben estar presentes a una concentración superior a 100000 $\mu\text{g/l}$ en leche para producir halos inhibitorios.

En forma similar, Althaus *et al.* (2009) cuando emplean el SMMP con muestras de leche de oveja, señalan que concentraciones de un orden a magnitud de 10 veces el LMR (1000 $\mu\text{g/l}$) producen interferencias en la placa que contiene *G. stearothermophilus*, mientras que niveles próximos a unas 40 veces el LMR (4000 $\mu\text{g/l}$) no producen halos inhibitorios en la placa de tetraciclinas (*B. cereus*).

IV.2.4.4. Límites de detección de otros antimicrobianos en leche con el SMmp2

La respuesta de los tres bioensayos para aminoglucósidos, macrólidos y quinolonas se sintetizan en la Tabla IV.63 (Bioensayo "B"), Tabla IV.64 (Bioensayo "T") y Tabla IV.65 (Bioensayo "S").

El Bioensayo "B" muestra un elevado valor del coeficiente " β_1 " para el análisis de residuos de tilosina en leche ($\beta_1= 0.1268$) y valores medios para lincomisina ($\beta_1= 0.0568$) y eritromicina ($\beta_1=0.0338$), en comparación con el resto de antimicrobianos analizados con este método. Los coeficientes de concordancia para el Bioensayo "B" fueron más elevados para los aminoglucósidos que para los macrólidos y quinolonas, aunque en todos los casos fueron elevados, al estar comprendidos entre 74.8% para marbofloxacina y 89.9% para neomicina.

Tabla IV.63. Modelos logísticos de las curvas dosis-respuestas de otros agentes antimicrobianos en leche analizados con Bioensayo “B” (*G. stearothermophilus*)

Antimicrobiano	Logit [P] = $\beta_0 + \beta_1$ [Antimicrobiano]	C
<i>Aminoglucósidos</i>		
Estreptomicona	Logit [P] = -12.2483 + 0.0006 [STR]	89.5
Gentamicina	Logit [P] = -9.0399 + 0.0249 [GEN]	89.3
Kanamicina	Logit [P] = -17.5433 + 0.0025 [KAN]	87.3
Neomicina	Logit [P] = -11.5338 + 0.0100 [NEO]	89.9
<i>Macrólidos</i>		
Eritromicina	Logit [P] = -6.5414 + 0.0338 [ERI]	84.9
Espiramicina	Logit [P] = -8.3928 + 0.0034 [SPI]	85.6
Lincosamina	Logit [P] = -8.5256 + 0.0568 [LINC]	89.7
Tilosina	Logit [P] = -6.9871 + 0.1268 [TIL]	81.4
<i>Quinolonas</i>		
Ciprofloxacina	Logit [P] = -8.4028 + 0.0028 [CIP]	82.9
Enrofloxacina	Logit [P] = -11.4001 + 0.0036 [ENR]	86.3
Marbofloxacina	Logit [P] = -6.5532 + 0.0013 [MAR]	74.8
Norfloxacina	Logit [P] = -6.3874 + 0.0007 [NOR]	86.1

STR: estreptomicona, GEN: gentamicina, KAN: kanamicina, NEO: neomicina, ERI: eritromicina, SPI: espiramicina, LINC: lincomicina, TIL: tilosina, CIP: ciprofloxacina, ENR: enrofloxacina, MAR: marbofloxacina, NOR: norfloxacina. C: Coeficiente de concordancia porcentual.

A su vez el Bioensayo “T” presenta un valor aceptable de este coeficiente para residuos de eritromicina en leche ($\beta_1 = 0.1219$), mientras que los demás antibióticos muestran bajos valores de pendiente (Tabla IV.64).

Con respecto al Bioensayo “S”, la Tabla IV.65 señala adecuados valores de los coeficientes “ β_1 ” para eritromicina ($\beta_1 = 0.2741$) tilosina ($\beta_1 = 0.1161$) y valores medios para las cuatro quinolonas estudiadas ($\beta_{1, CIP} = 0.0728$, $\beta_{1, ENR} = 0.0461$, $\beta_{1, MAR} = 0.0597$, $\beta_{1, NOR} = 0.0260$), en comparación con los demás antimicrobianos. Este hecho pone de manifiesto cierta sensibilidad por parte del *B. subtilis* para detectar residuos de estos compuestos en leche.

Para el Bioensayo “B”, Bioensayo “T” y Bioensayo “S”, se construyeron las gráficas que presentan los efectos de las concentraciones de aminoglucósidos (Figura IV.56, Figura IV.59 y Figura IV.62, respectivamente), macrólidos (Figura IV.57, Figura IV.60 y Figura IV.62, respectivamente) y quinolonas (Figura IV.58, Figura IV.61 y Figura IV.64, respectivamente) sobre las frecuencias relativas de resultados positivos.

Tabla IV.64. Modelos logísticos de las curvas dosis-respuestas de otros agentes antimicrobianos en leche analizados con Bioensayo “T” (*B. cereus*)

Antimicrobiano	Logit [P] = $\beta_0 + \beta_1$ [Antimicrobiano]	C
<i>Aminoglucósidos</i>		
Estreptomicina	Logit [P] = -13.3971 + 0.0025 [STR]	90.1
Gentamicina	Logit [P] = -5.7961 + 0.0022 [GEN]	77.9
Kanamicina	Logit [P] = -9.7385 + 0.0014 [KAN]	82.1
Neomicina	Logit [P] = -8.8029 + 0.0018 [NEO]	80.3
<i>Macrólidos</i>		
Eritromicina	Logit [P] = -12.9360 + 0.1219 [ERI]	90.6
Espiramicina	Logit [P] = -15.5633 + 0.0022 [SPI]	88.4
Lincosamina	Logit [P] = -2.9145 + 0.0034 [LINC]	83.5
Tilosina	Logit [P] = -9.0399 + 0.0125 [TIL]	89.3
<i>Quinolonas</i>		
Ciprofloxacina	Logit [P] = -4.2307 + 0.0031 [CIP]	81.5
Enrofloxacina	Logit [P] = -13.5394 + 0.0071 [ENR]	86.2
Marbofloxacina	Logit [P] = -20.6893 + 0.0076 [MAR]	86.8
Norfloxacina	Logit [P] = -5.0603 + 0.0012 [NOR]	79.8

STR: estreptomina, GEN: gentamicina, KAN: kanamicina, NEO: neomicina, ERI: eritromicina, SPI: espiramicina, LINC: lincomicina, TIL: tilosina, CIP: ciprofloxacina, ENR: enrofloxacina, MAR: marbofloxacina, NOR: norfloxacina. C: Coeficiente de concordancia porcentual.

Para los aminoglucósidos, 500 $\mu\text{g/l}$ de gentamicina producen el 100% de resultados positivos en los Bioensayos “B” y “S”, mientras que las demás moléculas deben estar presentes en concentraciones muy elevadas (comprendidas entre >2000 $\mu\text{g/l}$ para neomicina con el Bioensayo “B” y 10000 $\mu\text{g/l}$ para kanamicina con los Bioensayos “B” y “T”) producir resultados positivos a los métodos.

En cuanto a macrólidos, se debe destacar que bajas concentraciones (<200 $\mu\text{g/l}$) de tilosina (Bioensayos “B” y “S”), eritromicina (Bioensayo “T” y “S”), lincomicina (Bioensayo “B”) y niveles medios (<400 $\mu\text{g/l}$) de espiramicina (Bioensayo “S”) producen resultados positivos.

Tabla IV.65. Modelos logísticos de las curvas dosis-respuestas de otros agentes antimicrobianos en leche analizados con Bioensayo “S” (*B. subtilis*)

Antimicrobiano	Logit [P] = $\beta_0 + \beta_1$ [Antimicrobiano]	C
<i>Aminoglucósidos</i>		
Estreptomicina	Logit [P] = -13.187 + 0.0033 [STR]	83.4
Gentamicina	Logit [P] = -5.24025 + 0.0124 [GEN]	88.9
Kanamicina	Logit [P] = -16.4721 + 0.0045 [KAN]	86.3
Neomicina	Logit [P] = -11.2234 + 0.0038 [NEO]	87.2
<i>Macrolidos</i>		
Eritromicina	Logit [P] = -5.63346 + 0.2741 [ERI]	84.9
Espiramicina	Logit [P] = -7.4622 + 0.0306 [SPI]	84.2
Lincosamina	Logit [P] = -10.0015 + 0.0178 [LINC]	83.5
Tilosina	Logit [P] = -10.8928 + 0.1161 [TIL]	86.3
<i>Quinolonas</i>		
Ciprofloxacina	Logit [P] = -8.0885 + 0.0728 [CIP]	90.1
Enrofloxacina	Logit [P] = -4.6098 + 0.0461 [ENR]	78.4
Marbofloxacina	Logit [P] = -6.35987 + 0.0597 [MAR]	89.9
Norfloxacina	Logit [P] = -6.5211 + 0.0260 [NOR]	81.8

STR: estreptomicina, GEN: gentamicina, KAN: kanamicina, NEO: neomicina, ERI: eritromicina, SPI: espiramicina, LINC: lincomicina, TIL: tilosina, CIP: ciprofloxacina, ENR: enrofloxacina, MAR: marbofloxacina, NOR: norfloxacina. C: Coeficiente de concordancia porcentual.

Con respecto a los residuos de quinolonas en leche, los resultados de la Figura IV.64, señalan que estos compuestos merecen especial atención. En efecto, las quinolonas suelen ser detectadas utilizando *E. coli* (forma vegetativa) como bacteria-test, sin embargo, Bioensayo “S” que emplea *B. subtilis* (forma esporulada), logra detectar residuos de ciprofloxacina, enrofloxacina y marbofloxacina a concentraciones cercanas a las 200 $\mu\text{g/l}$ y la norfloxacina a niveles de 400 $\mu\text{g/l}$. Por ello, se tratará con más detalle en apartados siguientes.

Haciendo uso de las ecuaciones logísticas de Tabla IV.63, IV.64 y IV.65 y del criterio sugerido por IDF-FIL (IDF-FIL, 2002) se calcularon los límites de detección de los doce antimicrobianos en leche para los tres bioensayos, que se expone en la Tabla IV.66 junto a los LMRs establecidos por la legislación.

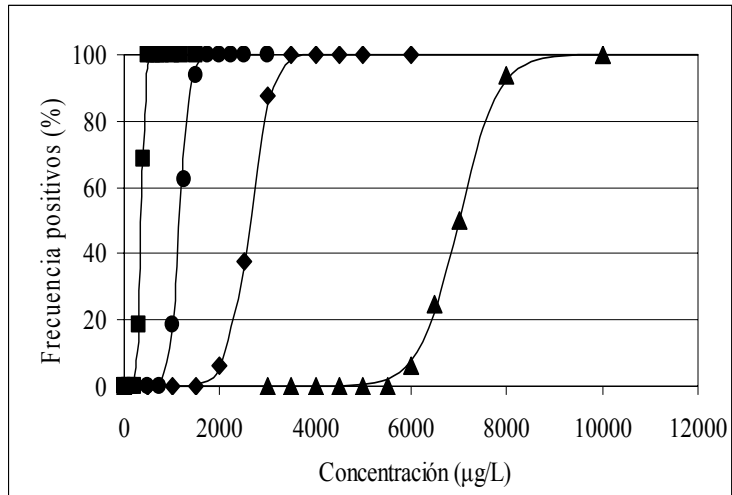


Figura IV.56. Curvas dosis respuestas de aminoglucósidos en leche analizadas con Bioensayo "B" (◆: estreptomicina, ■: gentamicina, ▲: kanamicina, ●: neomicina).

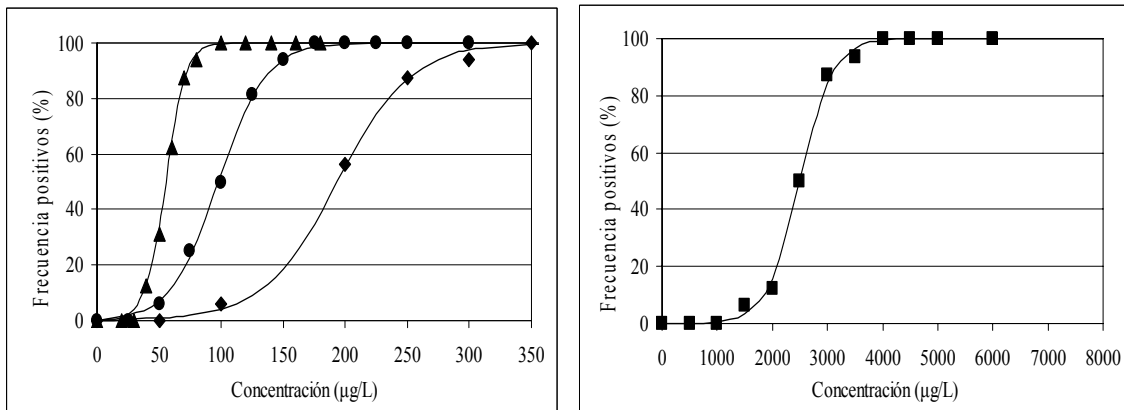


Figura IV.57. Curvas dosis respuestas de macrólidos en leche analizadas con Bioensayo "B" (◆: eritromicina, ■: espiramicina, ●: lincomicina, ▲: tilosina).

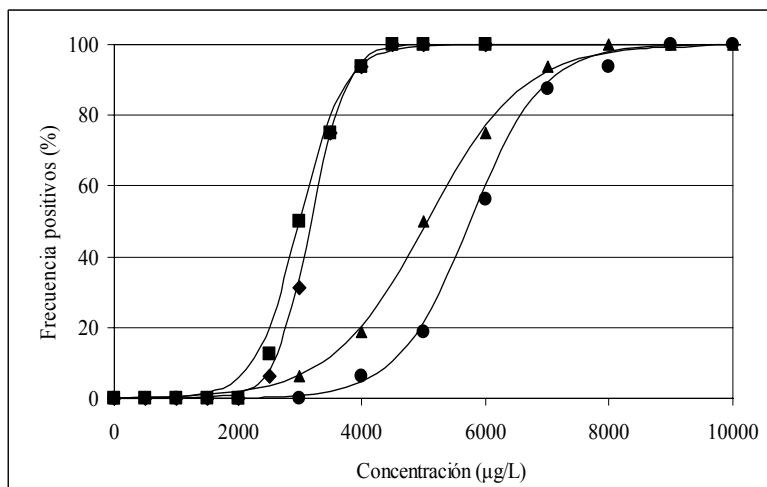


Figura IV.58. Curvas dosis respuestas de quinolonas en leche analizadas con Bioensayo "B" (■: ciprofloxacina, ◆: enrofloxacin, ▲: marbofloxacina, ●: norfloxacina).

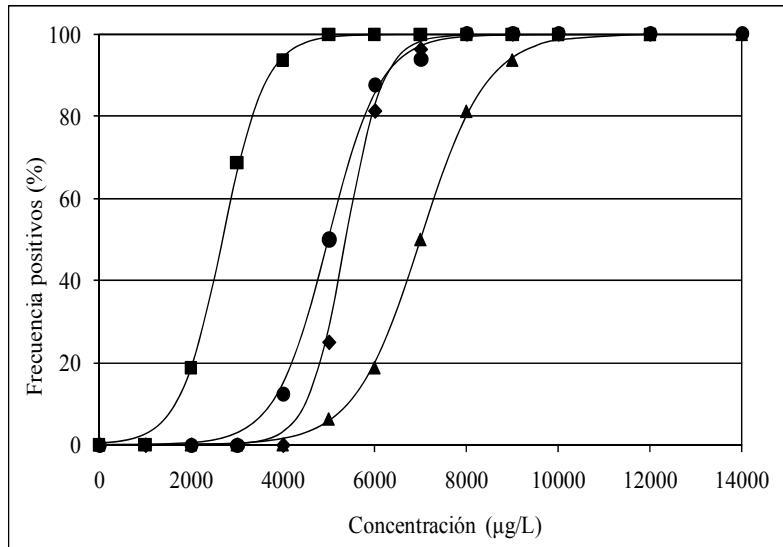


Figura IV.59. Curvas dosis respuestas de aminoglucósidos en leche analizadas con Bioensayo "T" (◆: estreptomicina , ■: gentamicina , ▲: kanamicina , ●: neomicina).

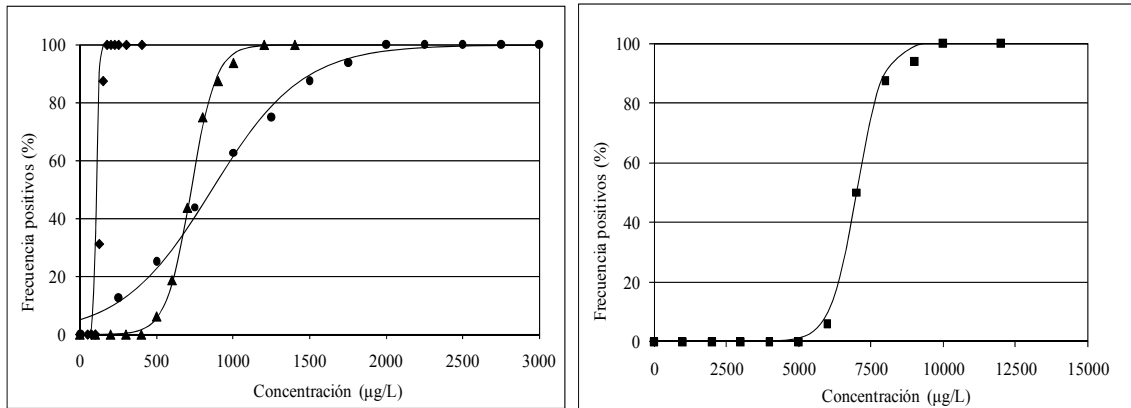


Figura IV.60. Curvas dosis respuestas de macrólidos en leche analizadas con Bioensayo "T" (◆: eritromicina , ■: espiramicina , ●: lincomicina , ▲: tilosina).

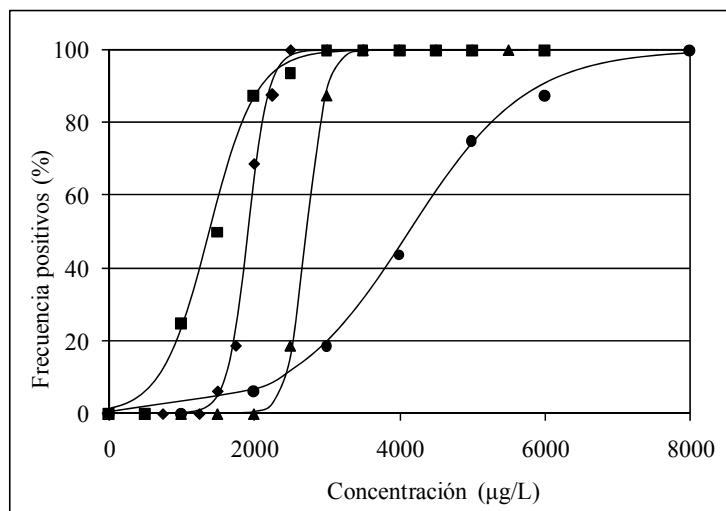


Figura IV.61. Curvas dosis respuestas de quinolonas en leche analizadas con Bioensayo "T" (■: ciprofloxacina , ◆: enrofloxacina , ▲: marbofloxacina , ●: norfloxacina).

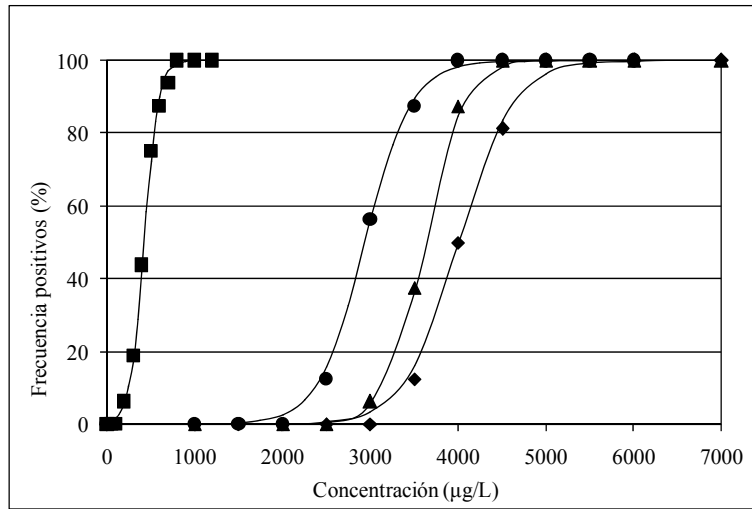


Figura IV.62. Curvas dosis respuestas de aminoglucósidos en leche analizadas con Bioensayo “S” (◆: estreptomicina, ■: gentamicina, ▲: kanamicina, ●: neomicina).

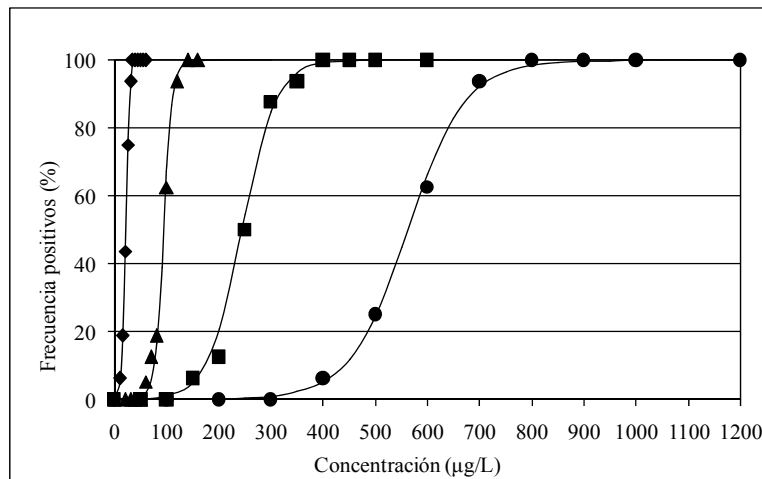


Figura IV.63. Curvas dosis respuestas de macrólidos en leche analizadas con Bioensayo “S” (◆: eritromicina, ■: espiramicina, ●: lincomicina, ▲: tilosina).

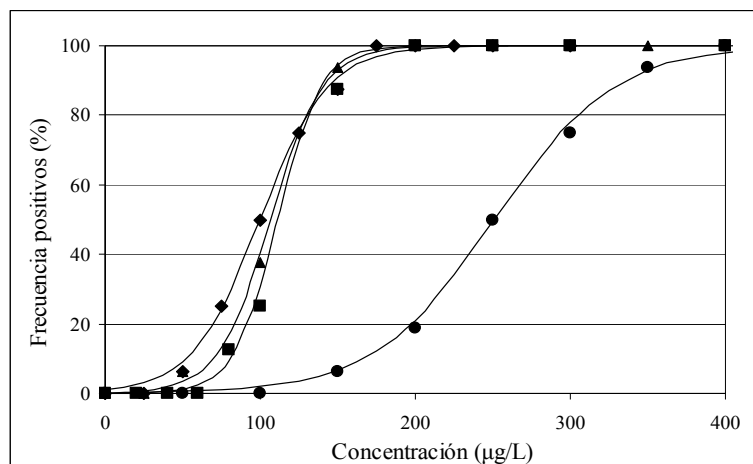


Figura IV.64. Curvas dosis respuestas de quinolonas en leche analizadas con Bioensayo “S” (■: ciprofloxacina, ◆: enrofloxacina, ▲: marbofloxacina, ●: norfloxacina).

Tabla IV.66. Límites de detección de otros antimicrobianos en leche para el SMmp2

Antimicrobianos	Límites de detección ($\mu\text{g/l}$)			LMR ($\mu\text{g/l}$)
	Bioensayo "B"	Bioensayo "T"	Bioensayo "S"	
<i>Aminoglucósidos</i>				
Estreptomicina	24000	6600	4900	200
Gentamicina	480	4000	660	100
Kanamicina	8200	9100	4300	150
Neomicina	1400	6700	3700	1500
<i>Macrólidos</i>				
Eritromicina	280	130	31	40
Espiramicina	3400	8300	340	200
Lincosamina	200	1700	730	150
Tilosina	78	960	120	50
<i>Quinolonas</i>				
Enrofloxacin	4000	2300	160	100
Ciprofloxacina	4053	2315	151	100
Marbofloxacina	7300	3100	160	75
Norfloxacina	14000	6500	360	-

LMR: Límite Máximo de Residuos.

De todos los aminoglucósidos estudiados, solamente los residuos de neomicina pueden ser detectados mediante el Bioensayo "B" (1400 $\mu\text{g/l}$) a niveles próximos a su LMR (1500 $\mu\text{g/l}$) y con el Bioensayo "S" a una concentración superior a dos veces su LMR (3700 $\mu\text{g/l}$). Por el contrario, cuando se analiza la familia de macrólidos, se desglosa que todos pueden ser detectados por el SMmp2. Así, el Bioensayo "S" detecta residuos de eritromicina (31 $\mu\text{g/l}$) a una concentración menor a su LMR (40 $\mu\text{g/l}$), "espiramicina" (340 $\mu\text{g/l}$) y tilosina (120 $\mu\text{g/l}$) a niveles ligeramente superiores a sus LMRs (200 $\mu\text{g/l}$ y 50 $\mu\text{g/l}$, respectivamente). En forma similar, el Bioensayo "B" detecta residuos de lincomisina (200 $\mu\text{g/l}$) y tilosina (78 $\mu\text{g/l}$) a niveles próximos a sus LMRs.

De este modo, los residuos de los cuatros macrólidos son detectados mediante el uso dos microplacas en forma simultánea, garantizando de este modo la seguridad alimentaria puesto que se amplía el número de antimicrobianos a detectar con el SMmp2. Sin embargo, desde el punto de la especificidad cruzada, esta interferencia

dificulta la posterior identificación de los residuos cuando las muestras de leche se analizan con este sistema.

Esta interferencia podría solucionarse mediante el empleo de un método que haga uso de un microorganismo específico para macrólidos, como *Kocuria rhizophila* (anteriormente denominado *Micrococcus luteus*) sugerido por Nouws *et al.* (1998). En efecto, dichos autores al utilizar la placa de Petri que contiene células de *K. rhizophila* miden halos inhibitorios para muestras de leche enriquecidas con 10 µg/l de eritromicina, 75 µg/l de espiramicina, 100 µg/l de lincomicina o 100 µg/l de tilosina.

En forma similar, Althaus *et al.* (2009), cuando analizan leche de oveja en la placa de Petri específica del SMMP que emplea *K. rhizophila*, miden halos inhibitorios para muestras que contienen 21.8 µg/l de eritromicina y 21.1 µg/l de espiramicina, aunque las lecturas se efectuaron transcurrido un tiempo de incubación comprendido entre 18 y 24 horas.

Sin embargo, se debe destacar que el empleo de una forma vegetativa como *K. rhizophila* resulta poco práctico en el momento de diseñar un bioensayo en microplacas, ya que implica una etapa de liofilización de estas formas vegetativas a fin de poder ser transportadas y comercializadas como un método de screening de uso rutinario. Por el contrario, el trabajo con bioensayos que emplean formas esporuladas (*G. stearothermophilus*, *B. subtilis*), tales como los Bioensayos “B” y “S”, facilita su implementación en un laboratorio que analiza numerosas muestras de leche en forma periódica. Por todo ello, esta ventaja debería evaluarse en profundidad y con mayores detalles en otros estudios.

Por último, es de destacar que, las quinolonas pueden detectarse cuando están presentes en leche a niveles cercanos a sus LMRs mediante el Bioensayo “S”, ya que se requieren 160 µg/l de enrofloxacin, 151 µg/l de ciprofloxacina o 160 µg/l de marbofloxacina para producir un cambio nítido en la coloración de los indicadores redox presentes en el método. Por el contrario, las quinolonas deben hallarse en la leche a niveles muy elevados (comprendidos entre 2300 µg/l para la enrofloxacin con Bioensayo “T” y 14000 µg/l para norfloxacina con el Bioensayo “B”) para producir interferencias con el Bioensayo “S”.

Esta virtud hace que el Bioensayo “S” pueda implementarse dentro de un Sistema Microbiológico Multiresiduo para la identificación de quinolonas en leche, al no presentar especificidad cruzada con los otros métodos.

IV.2.4.5. Interpretación simultánea de los resultados obtenidos mediante el SMmp2

A modo de síntesis, se confeccionó la Tabla IV.67, donde se agrupan los resultados de los límites de detección de los diferentes antimicrobianos estudiados (Tabla IV.54, Tabla IV.58, Tabla IV.62 y Tabla IV.66) que poseen publicados sus LMRs y que fueron analizados por los tres bioensayos. En dicha tabla no se han incluido cefadroxil, cefuroxime y norfloxacin por no tener establecidos LMRs.

Para la construcción de la tabla se han utilizado simplemente los términos “Sí” o “No” para identificar aquellas moléculas que “son detectadas” o “no son detectadas” con cada microplaca de SMmp2 a niveles próximos a sus LMRs.

También, se emplearon diversas tonalidades de grises para clasificar a los fármacos según los diferentes niveles de detección de los métodos. Dicha tonalidad surge de comparar los límites de detección con su correspondiente LMRs. Así, los antibióticos que se encuentran en una tonalidad “gris oscuro” se detectan a un nivel comprendido entre el LMR y 3-5 veces su LMR, mientras que los fármacos que se resaltan con una tonalidad “gris claro” deben estar presentes a concentraciones comprendidas entre 5 y 10 veces su respectivo LMR para ser detectados. Estos antibióticos pueden ocasionar interferencias cuando están presentes a elevadas concentraciones en la leche y podría llevar a errores de interpretación cuando se emplea el SMmp2. Finalmente, aquellos antibióticos que no son detectados por los bioensayos, se colocan en fondo “blanco”.

Cuando se emplean los tres bioensayos en forma simultánea (SMmp2), se observa que el nivel de detección (sin efectuar una identificación) es muy bueno, ya que logra detectar prácticamente todas las moléculas estudiadas, a excepción de estreptomicina, kanamicina y gentamicina (que debe estar presente a un nivel equivalente a 5 veces su LMR).

Este mayor poder de detección por parte de SMmp2, representa una virtud en comparación con los resultados que brindan los métodos de inhibición microbiológica, que actualmente se utilizan (Delvotest[®], BRT AiM[®], Eclipse[®], Charm[®] AiM-96), ya que no llegan a detectar los residuos de las quinolonas y algunos macrólidos. En este sentido, la implementación del SMmp2 representa una mayor seguridad alimentaria, ya que se evitaría que la leche con residuos procedentes de otras moléculas que no se logran detectar, llegue al consumidor.

Tabla IV.67. Antimicrobianos detectados mediante el SMmp2

Antibiótico	Bioensayo "B"	Bioensayo "T"	Bioensayo "S"
Amoxicilina	Si	No	No
Ampicilina	Si	No	No
Cloxacilina	Si	No	No
Oxacilina	Si	No	No
Penicilina "G"	Si	No	Si
Cefalexina	Si	No	No
Cefoperazone	Si	No	No
Ceftiofur®	Si	No	Si
Clortetraciclina	No	Si	Si
Oxitetraciclina	No	Si	Si
Tetraciclina	No	Si	Si
Sulfadiazina	No	No	Si
Sulfadimetoxina	No	No	Si
Sulfametazina	No	No	Si
Sulfametoxazol	No	No	Si
Sulfatiazol	No	No	Si
Gentamicina	No	No	No
Kanamicina	No	No	No
Neomicina	Si	No	Si
Estreptomycin	No	No	No
Eritromicina	No	Si	Si
Espiromicina	No	No	Si
Lincomicina	Si	No	No
Tilosina	Si	No	Si
Ciprofloxacina	No	No	Si
Enrofloxacin	No	No	Si
Marbofloxacina	No	No	Si

□ Ausencia, □ 5 a 10 LMR, □ LMR - 3 a 5 LMR, No: No detectado, Si: detectado a nivel comprendido entre LMR y 3-5 LMR.

Desde el punto de vista de la identificación, los resultados del SMmp2 (Tabla IV.65) señalan que se puede identificar la presencia de residuos procedentes de antibióticos betalactámicos (resultados positivos a Bioensayo "B", negativos a "T" y negativos o positivos a Bioensayo "S", dependiendo de su concentración), tetraciclinas

(resultados positivos a Bioensayos “T” y “S” y negativo a “B”) y sulfamidas-quinolonas (resultados positivos a Bioensayo “S” y negativos a los otros dos). Este posible inconveniente se puede solucionar mediante la incorporación de disoluciones de ácido para-aminobenzoico (PABA) en la leche, que actúa como antagonista de las sulfamidas.

Otra forma de mejorar la resolución de este solapamiento de antibióticos (sulfamidas y quinolonas) se puede lograr mediante la incorporación de un cuarto método, Bioensayo “BS” que detecta las sulfamidas, pero no tiene sensibilidad para los residuos de quinolonas en leche.

Con respecto a los macrólidos, se presentan confusiones por especificidad cruzada en los resultados de los diferentes bioensayos. Así, por ejemplo los residuos de eritromicina producirán resultados positivos a Bioensayos “T” y “S”, confundiéndose con las tetraciclinas. Además, lincomisina y tilosina manifestarán su acción antimicrobiana en Bioensayo “B” y “S”, enmascarando sus resultados con los antibióticos betalactámicos. Por último, espiramicina acusará resultados positivos en Bioensayo “S”, originando una confusión con las sulfamidas y quinolonas.

Para resumir estas conclusiones, en la Tabla IV.68 se esquematiza la interpretación de los resultados provenientes de la aplicación del SMmp2 con muestras de leche.

Tabla IV.68. Interpretación de los resultados obtenidos con el SMmp2

Antimicrobiano	Nivel de detección	SMmp2		
		Bioensayo “B”	Bioensayo “T”	Bioensayo “S”
Betalactámicos	LMR	+(^a)	-	-
	>5-10 LMR	+(^b)	-	+(^b)
Tetraciclinas	1-3 LMR	-	+(^c)	+(^c)
Sulfamidas	2-4 LMR	-	-	+(^d)
Quinolonas	2 LMR	-	-	+(^d)
Ausencia		-	-	-

(^a): puede deberse a lincomisina o gentamicina, (^b): puede deberse a neomicina o tilosina, (^c): puede deberse a eritromicina, (^d): puede deberse a espiramicina.

IV.3. ESTRATEGIA ANALÍTICA PARA UNA ADECUADA DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS EN LA LECHE

Los Sistemas Microbiológicos en microplacas (SMmp1 y SMmp2) desarrollados en este trabajo, presentan ventajas con respecto a los Sistema Microbiológicos Multirresiduos (SMMR) en placas de Petri, debido a que resultan fáciles de utilizar, son más económicos, brindan resultados claros, confiables, en un tiempo relativamente breve (3 a 5 horas vs. 18 a 24 horas) y pueden además, llegar a implementarse en los laboratorios de control de calidad como un análisis de rutina.

Sin embargo, pueden plantearse alternativas diferentes basadas en las combinaciones de bioensayos individuales de los SMmp1 y SMmp2, con el propósito de lograr dos objetivos. Por un lado “*detectar*” la mayor cantidad posible de antibióticos en la leche a niveles similares a LMRs, y por el otro lado, “*identificar*” un gran número de moléculas pertenecientes a las diferentes familias de antimicrobianos que puedan aparecer en la leche.

Por ello, se procederá a plantear dos estrategias analíticas diferentes. Una, basada en una mejor “*detección*” de residuos de antibióticos que los actuales métodos de inhibición microbiológica, que permita acusar un mayor número de moléculas de antimicrobianos presentes en la leche. La otra estrategia, persigue una “*identificación*” más simple de las familias de antibióticos, mediante un número reducido de bioensayos, en comparación con los actuales SMMP.

IV.3.1. ESTRATEGIA ANALÍTICA PARA UNA MEJOR “DETECCIÓN” DE RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS EN LA LECHE

La Figura IV.65 muestra los límites de detección relativos (LD) a los correspondientes LMRs para aquellos antibióticos que poseen publicados sus Límites Máximos de Residuos (LMRs) para SMmp1 y SMmp2. El diagrama de tipo poligonal hace uso de una escala estandarizada (LD/LMR) propuesta por Suhren *et al.* (1996) y Reichmuth *et al.* (1997).

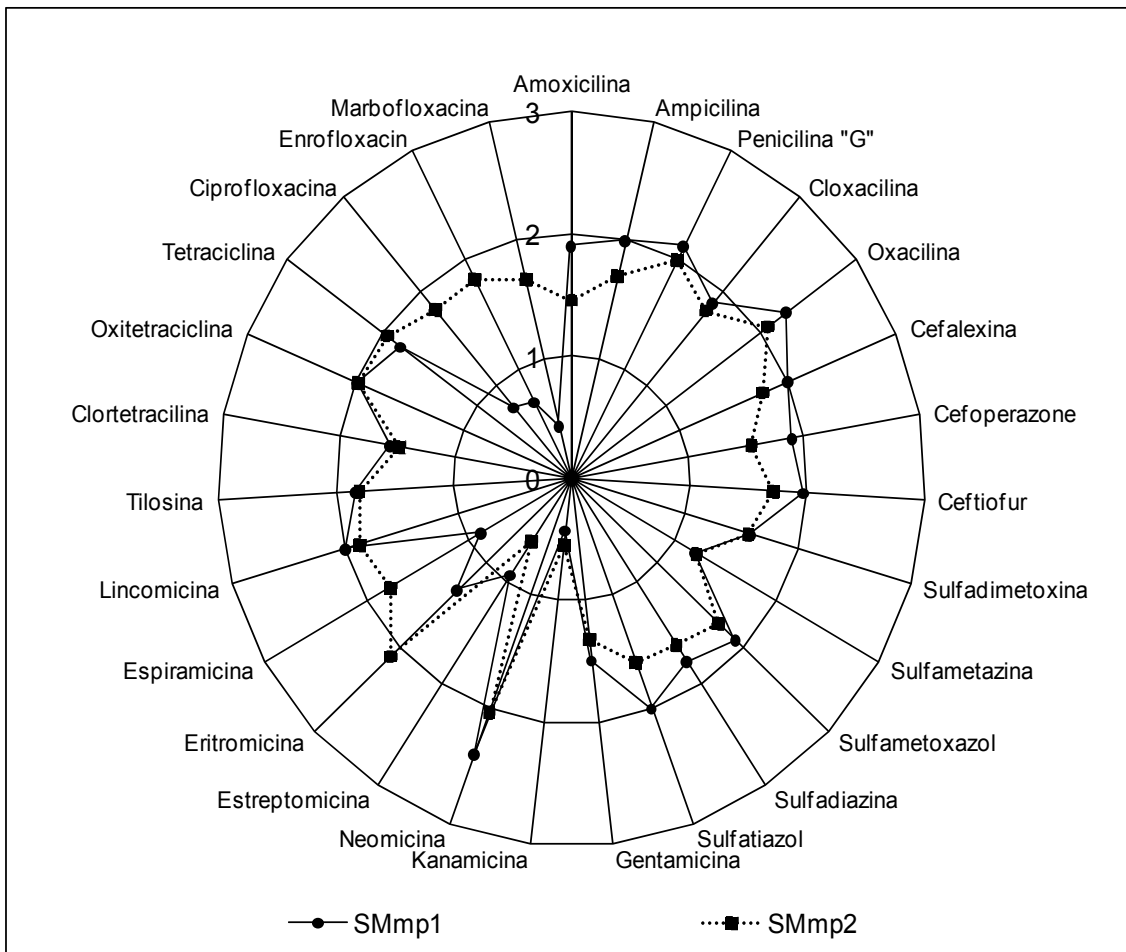


Figura IV. 65. Perfil de detección de SMmp1 y SMmp2 (Límites de detección expresados en escala logarítmica estandarizada "LD/LMR". Línea 1: 10 LD/LMR, Línea 2: LMR y Línea 3: 0.1 LD/LMR).

Esta escala fue construida aplicando la transformación Logarítmica a "LD/LMR" para cada antimicrobiano. El origen de coordenadas corresponde a los mayores niveles de concentraciones, mientras que las concentraciones disminuyen en la medida que se aleja del centro en forma radial. Por ello, el polígono interior corresponde concentraciones equivalentes a 10 veces "LD/LMR", el polígono central representa niveles equivalentes al "LMR", mientras que el polígono periférico corresponde a muestras de leche que contienen 0.1 veces "LD/LMR".

En dicha figura se observa que SMmp1 detecta adecuadamente residuos de betalactámicos, sulfamidas, tetraciclinas, neomicina, lincomisina, tilosina y en forma intermedia gentamicina, pero no llega a detectar kanamicina, estreptomicina, eritromicina, espiramicina y quinolonas.

Los principales métodos de inhibición microbiológica utilizados actualmente (BRT[®] AiM, Charm Blue Yellow[®], CMT Copan[®], Delvotest[®] SP-NT, Delvotest[®]

Accelerator, Eclipse[®] 50 y Eclipse[®] 100) emplean como microorganismo específico *G. stearothermophilus*, el mismo que utiliza SMmp1. El trabajo realizado por Roca *et al.* (2007) para el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAIPA, España) sobre la sensibilidad de estos métodos llega a resultados similares. En efecto, dichos autores señalan que estos métodos presentan sensibilidad adecuada para los principales antibióticos empleados en el tratamiento de mastitis, mientras que residuos de gentamicina, estreptomina, kanamicina y quinolonas no pueden ser detectados por falta de un método comercial con sensibilidad adecuada para estas moléculas.

Por ello, los test que se comercializan en la actualidad, no pueden ser considerados como “*métodos ideales*” por no detectar la totalidad de los residuos de antibióticos que puedan aparecer en la leche.

Por su parte, SMmp2 ajusta mejor a los LMRs (Línea 2 de la Figura IV.65) que SMmp1, puesto que deja sin detectar únicamente a los residuos de kanamicina y estreptomina. En efecto, el uso de tres bioensayos que emplean tres microorganismos de prueba, constituyen un mecanismo de control más eficiente que la utilización de un único método de cribado.

Sobre este tema, se debe mencionar el estudio realizado por Althaus *et al.* (2008) para el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPYA, España) acerca de la implementación de diferentes estrategias para el control de antibióticos, basadas en la combinación de diferentes metodologías analíticas de “screening”, a fin de garantizar la determinación de la mayor cantidad de sustancias antimicrobianas empleadas en el tratamiento del vacuno lechero a niveles establecidos por la legislación.

En dicho estudio se determinaron las frecuencias de antibióticos que pueden detectar los métodos microbiológicos BRT AiM[®] (74.29%), B-Y Test Charm[®] (74.54%), Copan[®] CH-ATK (66.86%), Delvotest[®] Accelerator (71.88%), Delvotest[®] SP-NT (59.68%), Eclipse[®] 100 (65.95%) y los métodos rápidos Beta STAR (57.78%), ROSA MRL BL Charm[®] (56.08%), SNAP BL (55.01%), Penzym[®] (47.47%), Twinsensor[®] BL (47.20%) y Delvo[®] XP (30.36%).

Debido a la baja cobertura que presentan estos métodos se analizó la implementación conjunta de dos métodos (uno microbiológico y otro específico). Las frecuencias de detección fueron de 76.55% (BRT[®] AiM y Twinsensor[®] BL-TET), 75.83% (Charm[®] B-Y Test y BETA Star[®]), 74.85% (Delvotest[®] Acc y Twinsensor[®] BL-TET), 73.97% (Eclipse[®] 100 y Twinsensor[®] BL-TET).

Los autores citados concluyen que, las frecuencias de detección no mejoran notablemente cuando se utilizan dos métodos de screening con respecto a las logradas con los métodos microbiológicos. Este hecho obedece a que los métodos específicos utilizados (a excepción Twinsensor® BL-TET) detectan únicamente antibióticos betalactámicos, los cuales ya son detectados perfectamente por *G. stearothermophilus*. Es decir, el análisis de muestras de leche empleando esta estrategia analítica no resulta adecuado, ya que no amplía el número de moléculas a detectar, como gentamicina, estreptomycin, kanamicina, lincomisina y enrofloxacin, que representan el 21.27% de los antibióticos empleados en España para el tratamiento de la mastitis.

Por todo ello, en dicho trabajo, se recomienda la necesidad de llevar a cabo estudios sobre otros métodos de detección, así como desarrollar metodologías con espectros de detección más adecuados para el análisis de otros grupos de antimicrobianos, como los aminoglucósidos, macrólidos y quinolonas, dada su elevada frecuencia de uso en vacuno lechero y la falta de sensibilidad de los métodos microbiológicos comercializados actualmente.

Mejores resultados se pueden lograr empleando diversos microorganismos de prueba, tal como sucede con los SMMP (Nouws *et al.*, 1999a,b; Tsai y Kondo, 2001; Gaudin *et al.*, 2004) o el SMmp2 que utiliza *G. stearothermophilus*, *B. cereus* y *B. subtilis*, ampliando el espectro de antibióticos a detectar (Figura IV.63).

Sin embargo, se puede pensar en una alternativa a ambos SMmp, de modo tal de combinar componentes de los SMmp1 y SMmp2. Así, por ejemplo, el empleo conjunto de Bioensayo “BT” del SMmp1 (que posee buena sensibilidad para betalactámicos, tetraciclinas, tilosina, lincomisina y neomicina) con Bioensayo “S” del SMmp2 (que presenta buena sensibilidad para sulfamidas, eritromicina, espiramicina y quinolonas) constituye una estrategia analítica eficiente. En efecto, dejando de lado la baja sensibilidad de ambos métodos para los residuos de kanamicina y estreptomycin, se observa que Bioensayo “S” (Tabla IV.52, Tabla IV.57, Tabla IV.61 y Tabla IV.65) actúa como un método complementario de Bioensayo “BT” (Tabla IV.15, Tabla IV.18, Tabla IV.21 y Tabla IV.24), cubriendo mediante dos análisis las mismas moléculas que se detectan utilizando los tres bioensayos del SMmp2.

Por ello, la Figura IV.66 muestra el perfil de detección logrado mediante la implementación de Bioensayo “BT” y Bioensayo “S” en forma simultánea. Se aprecia que, mediante el análisis conjunto con ambos métodos, los puntos correspondientes a

los límites de detección de la mayoría de los antibióticos, fluctúan alrededor de la línea equivalente a los LMR (a excepción de estreptomicina y kanamicina).

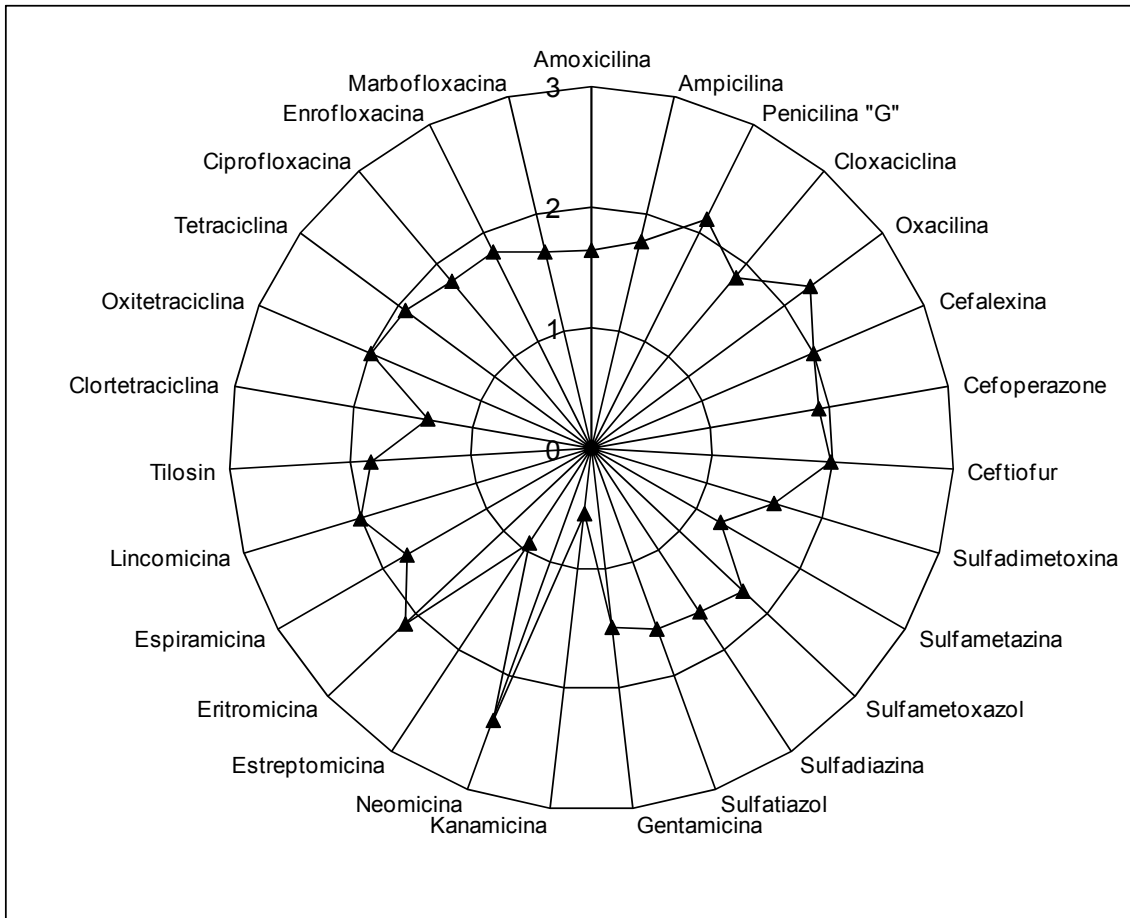


Figura IV. 66. Perfil de detección para la combinación de Bioensayo "BT" y Bioensayo "S" (Límites de detección expresados en escala logarítmica estandarizada "LD/LMR". Línea 1: 10 LD/LMR, Línea 2: LMR y Línea 3: 0.1 LD/LMR).

En resumen, esta alternativa analítica a SMmp1 y SMmp2, resulta simple de implementar en un plan estratégico de control de residuos, porque hace uso de tan solo dos métodos microbiológicos que pueden comercializarse bajo el formato de microplacas con esporas en medios de cultivos e indicadores, que poseen sensibilidad para una elevada cantidad de moléculas, en un tiempo de respuesta relativamente breve (3.0 y 5.5 horas) si se lo compara con los tiempos que demandan los SMMR en placas de Petri (18 a 24 horas).

IV.3.2. ESTRATEGIA ANALÍTICA PARA UNA MEJOR “IDENTIFICACIÓN” DE RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS EN LA LECHE

Entre las propiedades más importantes a considerar en el momento de implementar un Sistema Microbiológico Multirresiduos (SMMR) se destaca la “sensibilidad” de cada placa a una familia o grupo de antimicrobiano a la cual debe ser específica, es decir, las moléculas a detectar por una determinada placa deben presentar límites de detección cercanos a sus LMRs.

Además, un adecuado SMMR no debe presentar problemas de “especificidad cruzada”, en efecto, moléculas pertenecientes a una familia de antibióticos que son detectadas por una placa, no deben acusar resultados positivos en otra placa diferente del SMMP, evitando de este modo los problemas de interferencias, que traerán aparejado inconvenientes en su posterior interpretación de los resultados.

Con respecto a SMmp1, se observó en el apartado IV.1.4.2., que la implementación conjunta de los Bioensayos “BT” y “BS” permiten identificar residuos pertenecientes a tres familias: betalactámicos, tetraciclinas y sulfamidas, aunque la presencia de tilosina, neomicina y lincomisina producen interferencias con los resultados de los betalactámicos (Tabla IV.26). Por otra parte, residuos de otras familias de antimicrobianos, tales como las quinolonas, no llegan a ser detectados por el microorganismo de prueba empleado en este sistema (*G. stearothermophilus*).

SMmp2 presentó una adecuada identificación para antibióticos betalactámicos con Bioensayo “B” (*G. stearothermophilus*), tetraciclinas mediante Bioensayo “T” (*B. cereus*), mientras que Bioensayo “S” mostró buena sensibilidad para sulfamidas y quinolonas, denotando una interferencia entre ambas familias de antimicrobianos. Además, el SMmp2 presentó problemas de interferencias para lincomicina, gentamicina, tilosina, eritromicina y espiramicina (Tabla IV.66). No obstante, hay que destacar como una virtud del SMmp2, la capacidad de Bioensayo “S” para detectar residuos de quinolonas en la leche, que no son detectados mediante los actuales métodos de screening que se comercializan, como por ejemplo BRT[®] AiM, Charm Blue Yellow[®], Delvotest[®] SP-NT, Delvotest[®] Accelerator o Eclipse[®] 100 (Roca et al., 2007).

En este sentido, el beneficio adicional que muestra Bioensayo “S” para la detección de quinolonas en leche, no fue previsto en los objetivos generales del diseño de los SMmps. No obstante, esta virtud debe explotarse para incrementar el poder de identificación de SMmp1 y SMmp2 mediante la incorporación de una nueva microplaca que permita, por un lado identificar residuos de quinolonas en leche y, por otro lado,

disminuir los inconvenientes de especificidad cruzada de Bioensayo “S” hacia las sulfamidas y quinolonas.

Para ello, se pueden plantear dos alternativas analíticas diferentes a los SMmps diseñados anteriormente. La primera de ella consiste en incorporar el Bioensayo “S” al SMmp1, para lograr la identificación de las quinolonas en leche. La segunda alternativa se fundamenta en adicionar el Bioensayo “BS” al SMmp2, para clarificar la especificidad cruzada de las sulfamidas y quinolonas observada en el Bioensayo “S”.

La Tabla IV. 69. muestra la interpretación de los resultados que se puede obtener cuando se incorpora Bioensayo “S” a SMmp1. Se observa que los betalactámicos acusarían resultados positivos a los Bioensayos “BT” y “BS”, además, cuando están presentes a concentraciones superiores a 5 veces el LMR, también producirían resultados positivos al Bioensayo “S”.

Tabla IV.69. Interpretación de los resultados obtenidos mediante la aplicación simultánea de Bioensayos “BT”, “BS” y “S”

Antimicrobianos	Nivel de detección	Resultados		
		Bioensayo “BT”	Bioensayo “BS”	Bioensayo “S”
Betalactámicos	LMR	+(a)	+(a)	-
	>5LMR	+(b)	+(b)	+(b)
Tetraciclinas	1-3 LMR	+	-	+
Sulfamidas		-	+	+
Quinolonas				+(c)
Ausencia		-	-	-

Pueden presentarse interferencias debido a ^(a): lincomicina y gentamicina, ^(b): neomicina y tilosina, ^(c): eritromicina y espiramicina.

Resultados positivos a los Bioensayos “BT” y “S” pondrían de manifiesto la presencia de residuos de tetraciclinas en la leche, mientras que resultados positivos a los Bioensayos “BS” y “S” señalarían residuos de sulfamidas en leche. Por el contrario las quinolonas serán detectadas únicamente por el Bioensayo “S”.

Con respecto a los inconvenientes de especificidad cruzada, se resumen en la Tabla IV.69 que los residuos de lincomicina, gentamicina, tilomisina y neomicina se

verán confundidos con los antibióticos betalactámicos, mientras que la eritromicina y espiramicina pueden ser interpretados como quinolonas.

El primero de estos inconvenientes se puede solucionar mediante la realización de un análisis paralelo a Bioensayo “BT” o “BS”, mediante la incorporación de la enzima penicilinasasa (PENASA) a las muestras de leche. Esta enzima desdobla los anillos betalactámicos de estos residuos, como consecuencia de ello, dichas muestras que originalmente eran positivas a ambos métodos, acusarán resultados negativos cuando se vuelven a analizar con el agregado de esta enzima. De este modo, aquellas muestras de leche que continúan siendo positivas ante el agregado de PENASA, señalan la presencia de residuos que podrían ser aminoglucósidos (gentamicina, neomicina) o macrólidos (tilosina, lincomisina).

Una alternativa interesante para dilucidar los residuos pertenecientes a estas dos familias, se podría lograr mediante la incorporación de un cuarto bioensayo específico para aminoglucósidos. En efecto, estas moléculas son detectadas mediante el uso *B. subtilis* BGA a pH=8.0 (Brady y Katz, 1987; IDF-FIL, 1991; AFSSA, 1990; Nouws *et al.*, 1999a,b; Fuselier y Maris, 1999; Tsai y Kondo, 2001; Gaudin *et al.*, 2004). Además Nouws *et al.* (1995) proponen la incorporación de fenilbutazona a un bioensayo que utiliza *G. stearothermophilus* a pH=8.0 para mejorar la sensibilidad de los aminoglucósidos. Por todo ello, se podría pensar en diseñar un nuevo bioensayo haciendo uso de un microorganismo esporulado (como por ejemplo *B. subtilis*), con el agregado de fenilbutazona en el medio de cultivo e indicadores adecuados para lograr identificar residuos de aminoglucósidos.

Por el contrario, la identificación de los macrólidos, no resulta sencilla, puesto que los actuales SMMP utilizan formas vegetativas como *K. rhizophila* ATCC 9341 (Nouws *et al.*, 1999a,b; Tsai y Kondo, 2001). El diseño de un bioensayo que no utilice forma esporulada sería más dificultoso de elaborar y comercializar.

En forma similar, los residuos de espiramicina y eritromicina (macrólidos) no se pueden distinguir de los residuos de quinolonas en la interpretación del Bioensayo “S” de la Tabla IV.69.

Al respecto se debe destacar que los actuales SMMR también presentan estos inconvenientes de especificidad cruzada con los macrólidos. Nouws *et al.* (1999a,b) señalan interferencias cuando analizan muestras de leche que contienen 500 µg/l de tilosina, tilmicosina o eritromicina con las placas que utilizan *G. stearothermophilus*, *B. subtilis* pH=7.0 y *B. subtilis* pH=8.0, respecto a la placa específica para macrólidos (*K. rhizophila* ATCC 9341).

La segunda alternativa analítica para la identificación de antibióticos en leche, consiste en incorporar el Bioensayo “BS” al SMmp2. Haciendo uso de las lecturas de Tabla IV.26 y Tabla IV.68, se confeccionó la Tabla IV.70, que resume la interpretación de los resultados cuando se utiliza un sistema de cuatro métodos (Bioensayo “B”, “S”, “T” y “BS”) en forma simultánea.

En este sistema de cuatro bioensayos los betalactámicos se identifican por la presencia de resultados positivos en el Bioensayo “B” y en el Bioensayo “BS” aunque, elevadas concentraciones de estos antimicrobianos también producirán resultados positivos en el Bioensayo “S”. Las tetraciclinas serán identificadas por la presencia de resultados positivos a los Bioensayo “T” y “S”, mientras que las sulfamidas brindarán respuestas positivas al Bioensayo “S” y al Bioensayo “BS”. Las quinolonas se identificarán por presentar resultados positivos únicamente en el Bioensayo “S”.

Tabla IV.70. Interpretación de los resultados obtenidos mediante la aplicación simultánea de los Bioensayos “B”, “T”, “S” y “BS”

Antibióticos	Nivel de detección	Resultados			
		Bioensayo “B”	Bioensayo “T”	Bioensayo “S”	Bioensayo “BS”
Betalactámicos	LMR	+(a)	-	-	+(a)
	>5LMR	+(b)	-	+(b)	+(b)
Tetraciclinas	1-3 LMR	-	+(c)	+(c)	-
Sulfamidas	2-4 LMR	-	-	+	+
Quinolonas	2 LMR	-	-	+(d)	-
Ausencia		-	-	-	-

Pueden presentarse interferencias debido a ^(a): lincomisina y gentamicina, ^(b): neomicina o tilosina, ^(c): eritromicina, ^(d): espiramicina.

En forma similar a otros SMMR, se observan problemas de especificidad cruzada. Por ejemplo, las moléculas de lincomisina, gentamicina, tilosina y neomicina, se confundirán con betalactámicos. Una forma de clarificar esta interferencia se puede lograr mediante el empleo de PENASA, según se comentara anteriormente.

Nuevamente los macrólidos: eritromicina y espiramicina se confunden con los residuos de tetraciclinas y quinolonas, respectivamente. Comparando los resultados de Tabla IV. 69 y Tabla IV. 70 se puede establecer que el empleo de cuatro bioensayos no contribuye a clarificar los problemas de especificidad cruzada observados en el sistema que utiliza tres bioensayos.

Por ello, ambas estrategias analíticas permiten identificar las mismas familias de antibióticos y presentan los mismos inconvenientes de especificidad cruzada.

A modo de síntesis se puede establecer que resulta mas práctico implementar un sistema basado en tres métodos (Bioensayo "BT", "BS" y "S") que utilizan dos microorganismo de prueba (*G. stearothermophilus* y *B. subtilis*) acompañado de un cuarto análisis destinado a la prueba con PENASA, que un sistema de cuatro métodos (Bioensayos "B", "T", "S" y "BS") que emplea tres bacteria-test (*G. stearothermophilus*, *B. cereus* y *B. subtilis*) y la posterior prueba de PENASA. Este sistema (Tabla IV.69) permitirá identificar residuos pertenecientes a cuatro familias de antimicrobianos (betalactámicos, tetraciclinas, sulfamidas y quinolonas).

De este modo se puede disponer de un SMmp simple, económico, que utiliza esporas de microorganismos y que puede comercializarse bajo el formato de microplacas para una identificación de residuos en los laboratorios lactológicos encargados del control de calidad.

Conclusiones

V- CONCLUSIONES

De los resultados de este trabajo se deducen una serie de conclusiones que se exponen a continuación, teniendo en cuenta los distintos estudios y experimentos realizados y clasificándolas en función de ellos.

- **Sistema Microbiológico en Microplaca 1 (SMmp1):** Bioensayos “BT” y “BS”

- La aplicación del diseño robusto en la optimización de un bioensayo para la detección de penicilina “G” permite concluir que las variables volumen del medio, concentración de esporas, tiempo de difusión y tiempo de incubación afectaron la respuesta del método, no así la concentración del indicador. Cuando el bioensayo se elabora con 100 µl de medio de cultivo, 2×10^5 esporas/ml, 60 minutos de pre-difusión a 4°C y 3.0-4.0 horas de incubación a 64°C, se detecta 3.9-3.8 µg/l de la penicilina “G”, similar a su LMR (4 µg/l).

- La incorporación de 400 µg/l de cloranfenicol en la elaboración de Bioensayo “BT” no disminuye la selectividad del método (97.9%) y permite detectar residuos de betalactámicos y tetraciclinas a niveles cercanos a sus LMRs.

- La adición de 60 µg/l de trimetoprim en el medio de cultivo de Bioensayo “BS” no produce disminución en su selectividad (95.8%) y muestra adecuados niveles de detección para residuos de penicilinas, sulfadiazina, sulfametoxazol, sulfadimetoxina y sulfatioazol.

- La implementación del SMmp1 permite identificar residuos de betalactámicos (resultados positivos a ambos métodos), tetraciclinas (resultados positivos en el Bioensayo “BT” y negativos a “BS”) y sulfamidas (resultados positivos al Bioensayo “BS” y negativos al “BT”).

Los residuos de neomicina, lincosamina y tilosina son detectados por SMmp1 e identificados como betalactámicos, por la sensibilidad que presenta *G. stearothermophilus*. Los residuos de estreptomina, gentamicina, kanamicina, eritromicina, espiramicina y quinolonas no son detectados por este sistema.

- Sistema Microbiológico en *Microplaca 2 (SMmp2)* Bioensayos “B”, “T” y “S”

- Las técnicas estadísticas de análisis de superficie de respuesta y la función deseabilidad permiten elegir aquellas condiciones donde el Bioensayo “B” presenta adecuados niveles de detección para los betalactámicos y bajos límites de detección de las tetraciclinas. Estas condiciones se logran cuando el método se elabora con $2 \cdot 10^6$ esporas/ml y un tiempo de incubación de 4 horas 20 minutos.

- El incremento de la concentración de esporas de *B. cereus* en el medio de cultivo logra disminuir el tiempo de respuesta del Bioensayo “T” a 5.0 horas. La optimización del método mediante un diseño en matriz de Doherlet y la aplicación de la función deseabilidad revelan que las mejores condiciones se obtienen cuando el Bioensayo “T” se elabora con $1.3 \cdot 10^6$ esporas/ml y 470 $\mu\text{g/l}$ de cloranfenicol. Para estas condiciones, la selectividad fue elevada (99.4%) y los límites de detección de la oxitetraciclina (100 $\mu\text{g/l}$) y la tetraciclina (109 $\mu\text{g/l}$) resultaron próximos a sus LMRs.

- En forma similar, el incremento en la concentración de esporas de *B. subtilis* en el ensayo “S” disminuye el tiempo de respuesta del método (5 horas 30 minutos). La incorporación de 200 $\mu\text{g/l}$ de trimetoprim en el medio de cultivo mantiene elevados valores de selectividad (97.3%) y permite detectar residuos de sulfadiazina (240 $\mu\text{g/l}$), sulfadimetoxina (270 $\mu\text{g/l}$), sulfametoxazol (180 $\mu\text{g/l}$) y sulfatiazol (290 $\mu\text{g/l}$).

- El uso simultáneo de los tres bioensayos que integran el SMmp2 permite “detectar” prácticamente la gran mayoría de los antibióticos estudiados, a excepción de kanamicina y estreptomina. Además, este sistema permite “identificar” residuos de betalactámicos, tetraciclinas, sulfamidas-quinolonas. Por falta de especificidad, se pueden confundir residuos de lincosamina, gentamicina, neomicina y tilosina con betalactámicos, eritromicina con tetraciclinas y espiramicina con sulfamidas-quinolonas.

-Estrategia analítica para una adecuada detección de residuos de antibióticos

- El uso del Bioensayo “BT” (*G. stearothermophilus*) y del Bioensayo “S” (*B. subtilis*) representa una adecuada combinación analítica para la detección de un elevado número de agentes antimicrobianos en la leche, puesto que numerosas moléculas que no son detectadas por el primer microorganismo, pueden detectarse por el segundo y viceversa. De un total de treinta antibióticos utilizados, solamente estreptomina y kanamicina no pueden ser detectados por ambos bioensayos.

- Estrategia analítica para una mejor identificación de residuos de antibióticos

En este punto se plantean dos posibilidades de combinaciones de bioensayos que permiten “*identificar*” cuatro familias de antibióticos. La primer estrategia está formada por los Bioensayos “BT”, “BS” y “S” y la segunda consta de los cuatro Bioensayos “B”, “T”, “S” y “BS”. Para ambas combinaciones analíticas es posible identificar residuos de betalactámicos, tetraciclinas, sulfamidas y quinolonas en leche. Los residuos de lincomisina, gentamicina, neomicina y tilosina se verán confundidos con los betalactámicos, mientras que los residuos de eritromicina y espiramicina estarán enmascarados con las quinolonas.

Con el propósito de lograr una identificación más eficiente, y evitar los inconvenientes de especificidad cruzada; en un futuro, resultaría interesante llevar a cabo estudios complementarios mediante las pruebas de PENASA y PABA, así como también el diseño y la optimización de nuevos bioensayos que utilicen otros microorganismos de prueba como *B. megaterium* o *B. pumilus*, entre otros. De esta forma, se espera incrementar el número de familias a identificar y sustituir los actuales SMMR por SMmp de respuestas dicotómicas, de más fácil empleo, económicos y que permitan detectar un elevado número de residuos de antibioticos en la leche y, de este modo, colaborar con uno de los principios de la Seguridad Alimentaria que es la protección del consumidor.

Bibliografía

VI. BIBLIOGRAFIA

Adams H. R. 2003. Farmacología y terapéutica veterinaria. Ed. Acribia. Zaragoza, España.

Adriany, A.; Märtlbauer, E.; Zaadhof, K. 1995. A modified Brilliant black-Reduction Test (BRT) with improved sensitivity for tetracyclines and sulfonamides. 172-174. *In* Residues of Antimicrobial Drugs and Other Inhibitors in Milk. IDF S. I. N° 9505. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica.

Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA). 1990. Méthode officielle d'analyse relative à la détection des antibiotiques et des sulfamides dans les laits destinés à l'alimentation humaine ou animale. Communication du laboratoire LMV/ITC/FIC2. Laboratoire d'étude et de recherches sur les médicaments vétérinaires et les désinfectants. Fougères, Francia.

Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA). 1999. STAR Protocol. Screening test for Antibiotic Residues. Second step. Communication du laboratoire LMV/ ITC/PO5/12AN-V. Laboratoire d'étude et de recherches sur les médicaments vétérinaires et les désinfectants. Fougères, Francia.

Albright, V.; Tuckey, S.; Woods, G. 1961. Antibiotics in milk: A Review. *J. Dairy Sci.* 44: 770-807.

Althaus, R.; Molina, M. P.; Rodríguez, M.; Fernández, N. 2001a. Evaluation of the BRT method for detection of betalactams antibiotics in ewe milk. *Milchwissenschaft.* 56 (10): 568-572.

Althaus, R.; Molina, M. P.; Rodríguez, M.; Fernández, N. 2001b. Detection limits of betalactams antibiotics in ewe milk by Penzym[®] enzymatic test. *J. Food Prot.* 64: 1844-1847.

Althaus, R.; Peris, C.; Montero, A.; Torres, A.; Molina, M. P.; Fernandez, N. 2002. Detection limits of antimicrobial agents in ewe milk by Delvotest[®]. *Milchwissenschaft.* 57: 660-664.

Althaus, R.; Molina, M. P.; Peris, C.; Torres, A.; Fernández, N. 2003. Accuracy of BRT and Delvotest Microbial inhibition test as affected by composition of ewe's milk. *J. Food Prot.* 66: 473-478.

Althaus, R.; Roca, M.; Molina, M. P. 2008. Elaboración de posibles estrategias válidas para la detección de residuos de antimicrobianos en leche. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid. pp. 52.

Althaus, R.; Berruga, M.; Montero, A.; Roca, M.; Molina, M. 2009. Evaluation of a Microbiological Multi-Residue System on the detection of antibacterial substances in ewe Milk. *Anal. Chim. Acta.* 632: 156-162.

Analytic in Milch. 1998. The Brilliant Black Redution Test (BRT) Background and basic information 3/98. Informe Técnico Analytik in mich productions und Vertriebs-GmbH: 4.

Anderson, K.; Moats, W.; Rushing, J.; O'Carroll, J. 1998. Detection of milk antibiotic residues by use of screening test and liquid chromatography after intramammary administration of amoxicillin or penicillin G in cows with clinical mastitis. *AVJR.* 59: 1096-1100.

Andersen, W.; Roybal, J.; Gonzales, S.; Turnipseed, S.; Pfenning, A.; Kuck, L. 2005. Determination of tetracycline residues in shrimp and whole milk using liquid chromatography with ultraviolet detection and residue confirmation by mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta.* 529: 145-150.

Andrew, S. 2000. Effect of Fat and Protein Content of Milk from Individual Cows on the Specificity Rates of Antibiotic Residue Screening Tests. *J. Dairy Sci.* 83: 2992-2997.

Anthony, F.; Acar, J.; Franklin, A.; Gupta R.; Nicholls, T.; Yamura, S.; Thompson, S.; Threlfal, I; Vose, D.; Van Vuuren, M.; White, D. 2001. Antimicrobial resistance: responsible and prudent use of antimicrobial agents in veterinary medicine. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 20: 829-839.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 1984. Official Methods of Analysis. 42: 813-815. 14Th edition. Ed. AOAC. Arlington.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 2000. Official Methods of Analysis. 33: 39-44. 17Th edition. Ed. AOAC. Arlington.

Aureli, P.; Ferrini, A.; Mannoni, V. 1996. Presumptive identification of sulfonamide and antibiotic residues in milk by microbial inhibitors tests. *Food Control.* 7: 165-168.

Baynes, R.; Lyman, R.; Anderson, K.; Brownie, C. 1999. A preliminary survey of antibiotic residues and viable bacteria in milk from three Caribbean basin countries. *J. Food Prot.* 62: 177-180.

- Beukers, R. 1991. Some special aspects of Delvotest[®]. 20-23. *In* Inhibition substances in milk-current Analytical Practic. IDF Bull. N° 283. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica.
- Bishop, J.; White, C. 1984. Antibiotic residue detection in milk. A review. *J. Food Prot.* 47: 647-652.
- Bishop, J.; Bodine, A.; O'Dell, G.; Janzen, J. 1985. Quantitative assay for antibiotics used commonly in treatment of bovine infections. *J. Dairy Sci.* 68: 3031-3036.
- Bogaerts, R.; Wolf, F. 1980. A standardized method for the detection of residues of antibacterial substances in fresh meat. *Fleischwirtschaft.* 60: 672-673.
- Bogialli, S.; Curini, R.; Di Corcia, A.; Nazzarin, M.; Polci, M. 2003. Rapid confirmatory assay for determining 12 sulfonamides antimicrobials in milk and eggs by matrix solid phase dispersion and liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 51: 4225-4232.
- Booth, J.; Harding, F. 1986. Testing for antibiotic residues in milk. *Vet. Rec.* 238: 565-569.
- Botsoglou, N.; Fletouris, J. 1996. Analysis of Residual Antibacterians in Food of Animal Origin. *In* Handbook of Food Analysis, volume 2, Ed. Marcel Dekker, Inc. New York, USA.
- Botsoglou, N.; Fletouris, J. 2001. Drugs residues in foods: Pharmacology, food safety, and analysis. *In* Serie Food Science and technology. Ed. Marcel Dekker, Inc. New York, USA.
- Brady, M.; Katz, S. 1987. Simplified Plate Diffusion System for Microbial Assays of Antibiotics. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 70: 641-646.
- Busani, L.; Graziani, C.; Franco, A.; Di Egidio, A.; Grifoni, G.; Formato, G.; Sala, M.; Binkin, N.; Battisti, A. 2003. Antibiotic use in cattle farms: Results of a survey among veterinarians. *Bolletino Epidemiologico Nazionale (BEN)*, 16 n° 7-8.
- Bywater, R. 2004. Veterinary use of antimicrobials and emergence of resistance in zoonotic and sentinel bacteria in the EU. *J. Vet. Med.* 51: 361-363.
- CAA (Código Alimentario Argentino). 2001. Capítulo VII: Alimentos Lácteos (artículos 553-642). Decreto 2126/71 del Código Alimentario Argentino.
- Calhau, L.; Barbosa, M. 1990. Comparison of Delvotest P[®] and Penzyme[®] methods for the detection of antibiotic residues in cow and goat milk. XXIII International Dairy Congress. Montreal, Canada. Vol. I, 221.

- Calderón, V. 2001. Control sanitario de residuos de antibióticos en carnes por métodos microbiológicos. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, España. pp.217.
- Calderón, V.; Diez, P.; García, E.; 2003. Técnica de cribado de residuos de antibacteriano con cinco placas. Informe Técnico de laboratorio N° 75. Centro Nacional de Alimentación. Agencia Española de Seguridad Alimentaria. Laboratorio Nacional de Referencia. Madrid, España.
- Carlsson, A.; Björck L. 1987. The effect of some indigenous antibacterial factors in milk on the growth of *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*. *Milchwissenschaft*. 42: 283-285.
- Carlsson, A.; Björck, L. 1989. Lactoferrin and lysozyme in milk during acute mastitis and their inhibitory effect in Delvotest. *J. Dairy Sci.* 72: 3166.
- Carson, M.; Breslyn, W. 1996. Simultaneous determination of multiple tetracycline residues in milk by metal chelate affinity chromatography: collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 79: 29-42.
- Cavaliere, C.; Curini, R.; Di Corcia, A.; Nazzari, M.; Samperi, R. 2003. A simple and sensitive liquid chromatography-mass spectrometry confirmatory method for analysing sulphonamide antibacterial in milk and egg. *J. Agric. Food Chem.* 51: 558-566.
- CEE (Comunidad Económica Europea). 1990. 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.
- CEE (Comunidad Económica Europea). 1993. *Diario Oficial de la Comunidad Europea (DOCE)*. Directiva 93/257/CEE del Consejo del 15 de abril de 1993, L 118: 75-79.
- CEE (Comunidad Económica Europea). 2002a. 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. *DOCE*, L 73: 30-31.
- CEE (Comunidad Económica Europea). 2002b. Recomendación 2002/77/CEE del Consejo, de 15 de noviembre de 2001, sobre la utilización prudente de los agentes antimicrobianos en la medicina humana. *DOCE* L, 34: 13-16.
- CEE (Comunidad Económica Europea). 2004a. Reglamento 852/2004/CEE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, relativo a la higiene de los productos alimenticios. *DOCE*, L 139: 1-54.

CEE (Comunidad Económica Europea). 2004b. 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. DOCE, L 139: 55-205.

Cerniglia, C.; Kotarski, S. 1999. Evaluation of veterinary drug residues in food and their potencial to affect human intestinal microflora. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 29: 238-261.

Charm, S.; Ruth, G. 1993. Advances in Charm technology for Antimicrobial residues in milk. 32-46. *In* Inhibitory substances in milk-current analytical practice. IDF Bull. N° 283. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica.

Charm, S.; Zomer, E. 1995. The evolution and direction of rapid detection/identification of antimicrobial drug residues. 224-233. *In* Residues of Antimicrobial Drugs and Other Inhibitors in Milk. IDF S. I. N° 9505. International Dairy Federation. Bruselas, Belgica.

Cinquina, A.; Longo, F.; Anastasi, G.; Giannetti, I.; Cozzani, R. 2003. Validation of high-performance liquid chromatography method for the determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycyline in bovine milk and muscle. *J. Chromatogr.* 987: 227-233.

Codex Alimentarius, 1996. Residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos. Codex Alimentarius, 3. Programa conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias, FAO. Roma, Italia.

Codex Alimentarius, 2007. Examen de la labor realizada por la FAO, OMS y OIE sobre la resistencia a los antimicrobianos. Codex Alimentarius, 3. Programa conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias. FAO. Roma, Italia.

Comisión Del Codex Alimentarius. 2001a. Comité del Codex sobre residuos de Medicamentos Veterinarios en los Alimentos. Tema 8: Control de residuos de medicamentos Veterinarios en la leche y en los Productos lácteos. Reunión 4-7 Dic/2001. Charleston, Carolina del Sur, USA.

Comisión Del Codex Alimentarius. 2001b. Comité del Codex sobre residuos de Medicamentos Veterinarios en los Alimentos. Tema 12(a): Examen de Criterios con base en el desempeño para Métodos de Análisis de Residuos de Medicamentos Veterinarios en los Alimentos. Reunión 4-7 Dic/2001. Charleston, Carolina del Sur, USA.

Condón, S.; Pagán, R.; Sanz, D. 2006. Método de detección de antibióticos y otros compuestos antimicrobianos. Organización Mundial de Propiedad Intelectual. Patente N° WO 2006-058936 A1 del 8 de Junio de 2006.

- Coulson, A.; Rochford, J. 1985. Test of antibiotic residues in milk following with a multi-ingredient intramammary preparation. *Ir. Vet. J.* 39:111.
- Cullor, J. 1992. Test for identifying antibiotic residues in milk: how well do they work. *Vet. Med.* 87: 1235-1241.
- Cullor, J.; Van Eenennaam, A.; Smith, W.; Dellinger, J.; Perani, L.; Jensen, L. 1992. Antibiotic residue assays: can they be used to test milk from individual cows. *Vet. Med.* 87: 477-485.
- Cullor, J.; Van Eenennaam, A.; Gradner, Y.; Perani, L.; Dellinger, J.; Smith, W.; Thompson, T.; Payne, M.; Jensen, L.; Guterbock, W. 1994. Performance of various test used to screen antibiotic residues in milk samples from individual animals. *J. AOAC Int.* 77: 862-870.
- Currie, D.; Lynas, L.; Kennedy, G.; McCaughey, J. 1998. Evaluation of modified EC four plate method to detect antimicrobial drugs. *Food Addit. Contam.* 15: 651-660.
- Dalton, J. 2006. Antibiotic residue prevention in milk and dairy beef. *Western Dairy News.* 6: 71-79.
- Demoly, P.; Romano, A. 2005. Update on Beta-lactam allergy diagnosis. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 1: 9-14.
- Derringer, G.; Suich, R. 1980. Simultaneous optimization of several response variables. *J. Qual. Technol.* 12: 214-219.
- De Ruyck, H.; De Ridder, H. 2007. Determination of tetracycline antibiotics in cow's milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21: 1511-1520.
- De Zayas-Blanco, F.; García-Falcón, M.; Simal-Gándara, J. 2004. Determination of sulfamethazine in milk by solid phase extraction and liquid chromatographic separation with ultraviolet detection. *Food Control.* 15: 375-378.
- Debackere, M. 1995. Comparison of disk assay, Intest and Delvotest P sensitivity for antibiotic residues in milk. 41-53. *In Residues of Antimicrobial Drugs and Other inhibitors in Milk.* IDF S. I. N° 9505. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica
- Del prato, O. 1997. Gli inibenti nel latte e i loro effetti sulle trasformazioni casearie. *Il Latte.* 22: 40-48.
- Design Expert®. 2009. Design expert® release. Statistics trial version 7.1 for windows. Software for Design of experiments (DOE). Stat-Ease, Inc. Minneapolis, USA.

- Dewdney, J.; Maes, L.; Raynaud, J.; Blanc, F.; Scheid, J.; Jackson, T.; Lens, S.; Verschueren, C. 1991. Risk assessment of antibiotic residues of beta-lactams and macrolides in food-products with regard to their immunoallergic potential. *Food Chem. Toxicology*. 29: 477-483.
- Dey, B.; Thaker, N.; Bright, S.; Thaler, A. 2005a. Fast Antimicrobial Screen Test (FAST): Improved Screen Test for Detecting Antimicrobial Residues in Meat Tissue. *J. AOAC Int.* 88: 447-454.
- Dey, B.; Reamer, R.; Thaker, N.; Thaler, A. 2005b. Calf Antibiotic and Sulfonamide Test (CAST) for Screening Antibiotic and Sulfonamide Residues in Calf Carcasses. *J. AOAC Int.* 88: 440-446.
- Diserens, J.; Beck Henzelin, A.; Le Breton, M.; Savoy Perroud, M. 2005. Antibiotics in milk : Actual situation & compilation of commercial available screening methods for the detection of inhibitors/antibiotics residues in milk. Informe técnico: Quality & Safety Department, Nestlé Research Center. Lausanne, Switzerland. Pp. 186.
- Domínguez, L.; Moreno, M. 2001. Utilización de antimicrobianos en producción animal y otras alternativas. Conferencia Real Academia de Ciencias Veterinarias. Madrid, España.
- Edder, P.; Cominoli, A.; Corvi, C. 1997. Analysis of residues of sulfonamides in foods animal origin (liver, kidney, meat, fish, eggs, milk) by liquid chromatography with prederivatization and fluorometric detection. *Mitt. Geb. Lebensm. unters Hyg.* 88: 554-569.
- Erskine, R.; Wagner, S.; DeGraves, F. 2003. Mastitis therapy and pharmacology. *Vet. Clin. Food Anim.* 19: 109-138.
- Fabre, J.; Moretain, J.; 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. N° 9505. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica.
- FAVV (Federaal Agentschap voor de Veiligheid van de Voedselketen (Federal Agency for Safety of the Food Chain). 2003. Annual report. Belgica. Disponible en <http://www.favv.fgov.be>
- FDA (Food and Drug Administration). 2003. Guidance for industry: Analytical testing of drugs substances and drug products (Revision 2). The United States Food and Drug administration. Rockville, MD, USA.

M-I-96-10 Revision #3. Tables listing equivalent beta-lactam tests. Disponible en: <http://www.cdfa.ca.gov/ahfss/mdfc/pdfs/mi-96-10.pdf>.

Ferrini, A.; Mannoni, V.; Aureli, P. 1997. The Combined Plates Microbial Assay (CPMA) technique for the detection and presumptive identification of betalactam, sulfonamide, streptomycin and tetracycline residues in meat. *Archiv für Lebensmittelhygiene*. 48: 121-144.

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

FSIS (Food Safety and Inspection Service). 1991. Use of seeded monolayer bioassay plates for antibiotic assay of animal tissues. *Laboratory Communication* n° 65. Ed. Food Safety and Inspection Service. US Department of Agriculture. Washington D.C, USA.

Fugate, H. 1974. Determination of antibiotic residues in animal tissues. *In* *Microbiology Laboratory Guidebook*. Ed. Food Safety and Inspection Service. US Department of Agriculture. Washington D.C, USA.

Furusawa, N.; Kishida, K. 2001. High-performance liquid chromatographic procedure for routine residue monitoring of seven sulphonamides in milk. *J. Anal. Chem.* 371: 1031-1033.

Fuselier, R.; Cadieu, N.; Maris, P. 1999. Results of a proficiency testing for the analysis of carbadox and olaquinox residues in pig tissue. A.F.S.S.A. Community Reference Laboratory for Residues of Veterinary Drugs BP 90203 - 35302 FOUGERES Cedex – Francia.

Fuselier, R.; Cadieu, N.; Maris, P. 2000. S.T.A.R. Screening Test for Antibiotic Residues in Muscle Results of a European Collaborative Study. 444–448 *In*: *Proceedings of Euroresidue IV conference*. Ed. van Ginkel, Ruiters A. Veldhoven, The Netherlands.

Gardner, I.; Cullor, J.; Galey, F.; Sischo, W.; Salman M.; Slenning, H.; Tyler, J. 1996. Alternatives for validation of diagnostic assays used to detect antibiotic residues in milk. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 209: 46-52.

Gaudin, V.; Fontaine, J.; Maris, P. 2001. Screening of penicillin residues in milk by a surface plasmon resonance-based biosensor assay: comparison of chemical and enzymatic sample pre-treatment. *Analytica Chimica Acta*, 436:191-198.

- Gaudin, V.; Maris, P.; Fuselier, J.; Ribouchon N.; Cadieu, P; Rault, A. 2004. Validation of a microbiological method: the STAR protocol, a five-plate test for the screening of antibiotic residues in milk. *Food Addit. Contam.* 21: 422-433.
- Ghidini, S.; Zanardii, E.; Varisco, G.; Chizzolini, R. 2003. Residues of beta lactam antibiotics in bovine milk: confirmatory analysis by liquid chromatography tandem mass spectrometry after microbial assay screening. *Food Addit. Contam.*, 20: 528-534.
- Goursand, L. 1991. Composición y propiedades fisico-químicas. 1-92. *In* Leche y productos lácteos: vaca-oveja-cabra. Ed. Acribia, Zaragoza, España.
- Grove, D.; Randall, W. 1955. Assay methods of Antibiotics. 12-14. *In* Medical Encyclopedia, Inc. New York, USA.
- 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.
- Gudding, R. 1976. An improved bacteriological method for the detection of sulphonamide residues in food. *Acta vet. Scand.* 17: 458-464.
- Heeschen, W. 1993. Residues of antibiotics and sulfonamides in milk. 3-12. *In* Inhibitory substances in milk-current analytical practice. IDF Bull. N° 283. International Dairy Federation. Bruselas, Belgica.
- Heeschen, W.; Blüthgen, A. 1995. Veterinary drugs and pharmacologically active compounds. 16-39. *In* Residues and contaminants in milk products. IDF S. I. N° 9101. International Dairy Federation. Bruselas, Belgica.
- Heeschen, W.; Suhren, G. 1995. IDF integrated detection system for antimicrobials: Introductory statement and practical experiences in Germany. 310-318. *In* Residues of Antimicrobial Drugs and Other inhibitors in Milk. IDF S. I. N° 9505. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica.
- Hitchings, G. 1973. Mechanism of Action of Trimetoprim-Sulphametoxazole. I. *J Infect Dis.* 128: 5433-5436.
- Holstege, D.; Puschner, B.; Whitehead, G.; Galey, F. 2002. Screening and mass spectral confirmation of beta-lactam antibiotic residues in milk using LC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* 50: 406-411.
- Honkanen-Buzalski, T.; Reybroeck, W. 1995. Antimicrobials. 26-35. *In* Residues of antimicrobial drugs and other inhibitors in milk. IDF S. I. N° 9505. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica.

Honkanen-Buzalski, T.; Reybroeck, W. 1997. Antimicrobials. 26-34. *In* Residues and Contaminants in Milk and Milk Products. IDF-FIL. S.I. 9701. International Dairy Federation. Bruselas, Belgica.

Hozová, B.; Greifová, M. 1995. Comparison of disk assay, Intest and Delvotest P sensitivity for antibiotic residues in milk. Proceedings of the IDF-Symposium in Kiel, Alemania, agosto 28-31, Bruselas, Belgica, pp. 243.

IDF-FIL (International Dairy Federation). 1991. Detection and confirmation of inhibitors in milk and milk products. IDF Bull. N° 258. Internacional Dairy Federation. Bruselas, Bélgica.

IDF-FIL (International Dairy Federation). 1997. Guidance for the standardized description of microbial inhibitor test. IDF Grup E-503. Antibiotics, Appendix 3: 1-16.

IDF-FIL (International Dairy Federation). 2002. Guidance for the standardized description of microbial inhibitor test". IDF-FIL, Bull N° 183. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica.

IFAH (International Federation for Animal Health). 2006. Improving the quality of life for animals and people. Annual Report. IFAH. Bruselas, Bélgica.

Jacquet, J.; Auxepaules, M. 1978. Le problème de la pollution du lait par les antibiotiques. État actuel de la question. Bull. Acad. Vét. de France. 51: 73-79.

Jaskch, P. 1988. Der penzym test eine enzymatische schnellmethode zum nachweis von beta-lactam-antibiotika in Rohmilch. Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, Universität München, 29: 898-903

Jawetz, E.; Gunnison, J. 1952. An experimental basis of combined antibiotic action. Journal of the American Medical Association. 150: 693-695.

Johnston, R.; Reamer, R.; Harris, E.; Fugate, H. 1981. A new screening method for the detection of antibiotic residues in meat and poultry tissues. J. Food Prot. 44: 828-831.

Jones, G.; Seymour, E. 1988. Cowside Antibiotic Residue Testing. J. Dairy Sci. 71: 1691-1699.

Kaale, E.; Chambusco, M.; Kitwala, J. 2007. Analysis of residual oxytetracycline in fresh milk using polymer reversed-phase column. Food Chem. 107: 1289-12932.

Kavanagh, F. 1975. Microbiological Diffusion Assay II: Desing and Applications. J. Pharmaceutical Sci. 64: 1224-1229.

Kavanagh, F. 1989. Theory and practice of Microbiological assaying for Antibiotics. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 72: 6-10.

- Kelly, W. 1982. Qualitative ampule and multitest for betalactam residues in fluid milk products: collaborative study. *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* 65: 1193.
- Kishida, K.; Furusawa, N. 2004. Application of shielded column liquid chromatography for determination of sulfamonomethoxine, sulfadimetoxine, and their N4-acetyl metabolites in milk. *J. Chromatogr.* 1028: 175-177.
- Koenen-Dierick, K.; De Beer, J. 1998. Optimization of an antibiotic residue screening test, based on inhibition of *Bacillus subtilis* BGA, with experimental design. *Food Addit. Contam.* 15: 528–534.
- Koesukwiwat, U.; Jayantas, S.; Leepipatpiboon, N. 2007. Solid-phase extraction for multiresidue determination of sulfonamides, tetracyclines and pyrimethamine in bovine's milk. *J. Chromatogr.* 1149: 102-111.
- Kress, C.; Seidler, C.; Kerp, B.; Schneider, E.; Usleber, E. 2007. Experiences with an identification and quantification program for inhibitor-positive milk samples. *Anal. Chim.* 586: 257-279.
- Lacroix, D. 1995. Le dépistage des antibiotiques à la ferme le producteur de lait québécois. *Le Producteur de lait Québécois*: 30–31.
- Langeveld, P. 2005. Improved method for the determination of the presence of an antibiotic in fluid. World Intellectual Property Organization. Patent n° WO 2005/005656 A1 of 20 Jan. 2005.
- Langeveld, P., Beukers, R., Bommele, M. and Stark, J. 2005. Rapid microbiological test for the detection of antibacterial compounds. United States Patent. Patent n° US 6.867.015 B1 of 15 of Mar. 2005.
- Lessard, J.; Pestka, S. 1972. Studies on the formation of transfer ribonucleic acid-ribosome complexes. XXIII. Chloramphenicol, aminoacyl-oligonucleotides and *Escherichia coli* ribosomes. *J. Biol. Chem.* 247: 6909-6912.
- Linage, B.; Gonzalo, C.; Carriedo, J.; Asensio, J.; Blanco, M.; De la Fuente, L.; San Primitivo, F. 2007. Performance of Blue-Yellow Screening test for antimicrobial detection in ovine Milk. *J. Dairy Sci.* 90: 5374-5379.
- Löscher, W. 1994. Animal experiments in the development and evaluation of veterinary drugs. *Tierärztliche-Umschau.* 49: 67-68.
- Luitz, M.; Suhren, G.; 1995a. Advantages of photometric evaluation of microbial inhibitor test. 177-181. *In Residues of Antimicrobial Drugs and Other Inhibitors in Milk.* IDF S. I. N° 9505. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica.

- Luitz, M.; Suhren, G. 1995b. Evaluation of microbial inhibitor test with indicator in microtitre plates by photometric measurements. *Milchwissenschaft*, 50: 465-470.
- Luitz, M.; Suhren, G.; Heeschen, W. 1995. Interactions of antimicrobials in milk - consequences for the detection with Delvotest SP special. Proceedings of the IDF-Symposium in Kiel, Alemania, agosto 28-31. Bruselas, Bélgica.
- Luitz, M.; Suhren, G.; Hesschen, W. 1996. Interactions of antimicrobials in milk- Consequences for the detection by a microbial inhibitor test. *Milchwissenschaft*. 51: 390-392.
- Macho, M. 2003. Enzimoinmunoanálisis en el análisis de residuos de antibióticos. 15^a Jornada sobre Residuos en alimentos. CNA-AESA (Censo Nacional Agropecuario-Agencia Española de Seguridad Alimentaria).
- Marco, J.; García, I.; Zigorraga, C.; Molinero, M.; Azpiri, M. 2001. Evolución del uso de antimicrobianos en el tratamiento de enfermedades del ganado vacuno lechero y presencia de residuos inhibidores en leche de vaca cruda y tratada térmicamente. 1-8. Jornada Técnica sobre el uso de antimicrobianos en medicina veterinaria y sus posibles repercusiones en la salud pública. Bilbao, Portugal.
- Marques-Fontes, E.; Martins, S.; Carrapico, B. 1996. Determinations of penicillin G in commercialised milk by reverse phase high performance liquid chromatography. *Toxicol. Letters*. 81: 544.
- MCS. 2004. Milk control station on The Netherlands annual report 2004.
- Mateos, P. 2002. Agentes antimicrobianos y microorganismos. Curso de microbiología. Ingeniería de Alimentos. <http://geocities.com/College Park/Lab/2960/Mic20.htm>
- Martins Junior, H.; Kussumi, T.; Wang, A.; Lebre, T. 2007. A rapid method to determine antibiotic residues in milk using liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. *J. Braz. Chem. Soc.*, 18: 397-405.
- Mäyrä-Mäkinen, A. 1990. t-101 test for antibiotic residues in milk. *Scand. Dairy Inf.*, 2: 38-39.
- Mäyrä-Mäkinen, A. 1993. The Valio T 101. 29-31. *In* Inhibitory substances in milk - current analytical practice. Bulletin of the IDF N° 283. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica.
- Mäyrä-Mäkinen, A. 1995. Technological significance of residues for the dairy industry. 136-143. *In* Residues of Antimicrobial Drugs and Other Inhibitors in Milk. IDF S.I. N° 9505. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica.

- Mc Grane, P.; Rowe, M.T.; Anger, S. 1996. Evaluation of Delvotest SP and Charm AIM-96 for the detection a range of antibiotics in milk. *Milchwissenschaft*. 51: 330-332.
- Mendez, A.; Fernández, G.; Díaz, A.; Marco, J. 1999. Tratamiento de las mamitis bovinas. *Boris*. 86: 49-75.
- Merck & CO. 2003. El manual Merck de Veterinaria. 5ª ed. Ed. Océano. Barcelona.
- Miller, D. 1995. Present state and trends in the use of veterinary antimicrobials with particular reference to dairy cows. 15-26. *In* Residues of Antimicrobial drugs and other inhibitor in milk. . IDF S.I. N° 9505. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica.
- Mitchell, J.; Griffiths, M.; MC Ewen, S.; MC Nab, W.; Yee, A. 1998. Antimicrobial drug residues in milk and meat: causes, concerns, prevalence, regulations, test, and test performance. *J. Food. Prot.* 61: 742-756.
- Molina, M. P.; Segura, C.; Lujan, A.; Diaz, A.; Althaus, R.; Peris, C. 1999. Influencia del calentamiento y del tiempo de incubación sobre la respuesta del método BRT en la leche de cabra. *Industrias Lácteas Españolas*. 241: 37-41.
- Molina, M. P.; Althaus, R.; Balasch, S.; Torres, A.; Peris, C.; Fernandez, N. 2003. Evaluation of screening test for detection of antimicrobial residues in ewe milk. *J. Dairy Sci.* 86: 1947-1952.
- Montero, M., 2001. Puesta a punto de una técnica de postcribado, mediante un método microbiológico, para la detección de residuos de sustancias inhibitoras en leche cruda de vaca conservada con azidol. Trabajo fin de carrera. Universidad de Gerona. 251 pp.
- Montero, A.; Althaus, R.; Molina, A.; Berruga, I.; Molina, M. 2005. Detection of antimicrobial agents by specific microbiological metgod (Eclipse 100) for ewe milk. *Small Rum. Res.* 57: 229-237.
- Morétain, J. 1996. Elimination des médicaments vétérinaires dans le lait. XIII Reunión de Técnicos especialistas en control de mamitis y calidad de leche (G-Temcal). Pamplona, España.
- Mourot, D. ; Loussouarn, S. 1981. Sensibilité des ferments lactiques aux antibiotiques utilisés en médecine vétérinaire. *Rec. Med. Vét.* 157: 175-177.
- Müller, F.; Jones, J. 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.

- Myllyniemi, A.; Rannikko, R.; Lindfors, E.; Niemi, A.; Backman, C. 2000. Microbiological and chemical detection of incurred penicillin G, oxytetracycline, enrofloxacin and ciprofloxacin residues in bovine and porcine tissues. *Food Addit. Contam.* 17:991–1000.
- Myllyniemi, A.; Nuotio, L.; Lindfors, E.; Rannikko, R.; Niemi, A., Bäckman, C. 2001. A microbiological six-plate method for the identification of certain antibiotic groups in incurred kidney and muscle samples. *Analyst.* 126:641-646.
- Myers, R. 1964. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 7:11–36. Citado por Pikematt, M. 2009. Microbial screening methods for detection of antibiotic residues in slaughter animals. *Anal. Bioanal. Chem.*: 1-14.
- Myers, R.; Montgomery, D. 1995. *Response Surface Methodology*. Capítulo 6: The analysis of Reponse Surfaces. A. Wiley-Interscience. Publication John Wiley and Sons. INC. NY, USA.
- Nazina, T.; Tourova, T.; Poltarau, A.; Novikova, E.; Grigoryan, A.; Ivanova, A.; Lysenko, A.; Petrunyaka, W.; Osipov, G.; Belyaev, S.; Ivanov, M. V. 2001. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp nov and *Geobacillus uzenensis* sp nov from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G-stearothermophilus*, *G-thermocatenulatus*, *G-thermoleovorans*, *G-kaustophilus*, *G-thermoglucosidasius* and *G-thermodenitrificans*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 51: 433-446.
- Nolan, M.; Dooley, M.; Nugent, A.; O’Keeffe, M. 2000. Residues of veterinary drugs in foods. 781–785. *In Proceedings of Euroresidue IV conference*. Ed. van Ginkel, Ruiter A. Veldhoven, The Netherlands.
- Nouws, J.; Schothorst, M.; Ziv, G. 1979. A critical evaluation of several microbiological test methods for residues of antimicrobial drugs in ruminants. *Arch Lebensm Hyg* 30: 4-8.
- Nouws, J.; Broex, N.; Den Hartog, J.; Driessens, F. 1988. The new Dutch kidney test. *Archiv für lebensmittelhygiene.* 39: 135-138.
- Nouws, J.; Loeffen, G.; Schouten, J.; Egmond, H.; Stegeman, H. 1995. Improvement of the tube diffusion test with respect to detection of tetracycline, macrolide, aminoglycoside and sulfonamide residues in raw milk. 222-223. *In Residues of*

Antimicrobial Drugs and Other Inhibitors in Milk. IDF S. I. N° 9505. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica.

Nouws, J.; Loeffen, G.; Schouten, J.; Van Egmond, H.; Keukens, H.; Stegeman, H. 1998. Testing of raw milk for tetracycline residues. *J. Dairy Sci.* 81: 2341-2345.

Nouws, J.; Van Egmond, H.; Shulders, I.; Loeffen, G.; Schouten, J.; Stegeman, H. 1999a. A microbiological assay system for assessment of raw milk exceeding EU maximum residue level. *Int. Dairy J.* 9: 85-90.

Nouws, J.; Van Egmond, H.; Loeffen, G.; Schouten, J.; Keukens, H.; Smulders, I.; Stegeman, H. 1999b. Suitability of the charm hvs and a microbiological multiplate system for detection of residues in raw milk at eu maximum residue levels. *The Veterinary Quarterly.* 21: 21-27.

Oda, T.; Hiwaki, H. 1996. Heat stability of 24 antibiotics in food extracts. *J. Food. Hyg. Soc. Japan.* 37: 97-103.

Okerman, L.; De Wasch, K.; Van Hoof, J. 1998. Detection of antibiotics in muscle tissue with microbiological inhibition test: effect of the matrix. *Analyst.* 123: 2361-2365.

Okerman, L.; Croubels, S.; Baere, S.; Van Hoof, J.; De Backer, P.; De Brabander, H. 2001. Inhibition tests for detection and presumptive identification of tetracyclines, beta-lactam antibiotics and quinolones in poultry meat. *Food Addit. Contam.* 18: 385-393.

Okerman, L.; Noppe, H.; Cornet, V.; De Zutter, L. 2007. Microbiological detection of 10 quinolone antibiotic residues and its application to artificially contaminated poultry samples. *Food Addit. Contam.* 24: 252-257.

Packham, W.; Broome, M.; Limsowtin, G.; Roginski, H. 2001. Limitations of standard antibiotic screening assays when applied to milk for cheesemaking. *Australian J. Dairy Tech.* 56: 15-18.

Pikkemaat, M.; Mulder, P.; Elferink, J.; Cocq, A.; Nielen, M.; van Egmond, H. 2007. Improved microbial screening assay for the detection of quinolone residues in poultry and eggs. *Food Addit. Contam.* 24: 842-850.

Pikkemaat, M.; Ostra-van Dijk, S.; Schouten, J.; Rapallini, M.; van Egmond, H. 2008. A new microbial screening method for the detection of antimicrobial residues in slaughter animals: The Nouws antibiotic test (NAT-screening). *Food Control.* 19: 781-789.

Pikkemaat, M.; Rapallini, M.; Ostra-van Dijk, S.; Elferinka, J. 2009a. Comparison of three microbial screening methods for antibiotics using routine monitoring samples. *Anal. Chim. Acta.* 637: 298-304.

- Pikkemaat, M.; Ostra-van Dijk, S. ; Schouten, J. ; Rapallini, M. ; Kortenhoeven, L. ; van Egmond, H. 2009b. Nouws antibiotic test: Validation of a post-screening method for antibiotic residues in kidney. *Food Control*. 20: 771-777.
- Prescott, J.; Baggott, J.; Walker, R. 2002. *Terapútica Antimicrobiana en Medicina Veterinaria*. Ed. Inter-Médica. Iowa, USA.
- Rang, H.; Dale, M.; Ritter, J. 2000. Quimioterapia de enfermedades infecciosas y malignas. 742-748. *In Farmacología*, 4ª ed. Ed Harcourt. Madrid, España.
- Reichmuth, J.; Shuren, G.; Beukers, R. 1997. Evaluation of microbial inhibitor test- the IDF approach. *Milchwissenschaft*. 52: 691-695.
- Reybroek, W. 1994. Evaluation of screening test for the detection of antimicrobial residues in milk. Proceedings of the IDF. Symposium in Kiel, Alemania, agosto 28-31, Bruselas, Bélgica.
- Reybroek, W. 1995. Evaluation of screening test for the detection of antimicrobial residues in milk. 182-186. *In Residues of antimicrobial drugs and other inhibitors in milk*. IDF S. I. N° 9505. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica.
- Reybroek, W. 1995b. Sensitivity and selectivity of screening tests for the detection of antimicrobial residues in milk. 216-217. *In Residues of antimicrobial drugs and other inhibitors in milk*. IDF S. I. N° 9505. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica.
- Reybroek, W. 1995c. Field test of screening test for the detection of antimicrobial residues in milk. 218-221. *In Residues of Antimicrobial Drugs and Other Inhibitors in Milk*. IDF S. I. N° 9505. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica.
- Roca, M.; Borrás, M.; Molina, M. 2007. Evaluación de la validez de la determinación-semicuantificación de antibióticos en la leche cruda de vaca por los métodos comercializados en España. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid, España. pp. 106.
- Roca, M. 2008. Termoestabilidad de sustancias antimicrobianas en la leche. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia, España. pp. 225.
- Rogalsky, W. 1985. Chemical modification of the tetracyclines. 114-129. *In The tetracyclines* Ed.: Hlavka, J.; Boothe, J.; Springer, E. Berlin, Germany.
- Rueg, P.; Tabone, T. 2000. The relationship between antibiotic residue violations and somatic cell counts in Wisconsin dairy herds. *J. Dairy Sci*. 83: 2805-2809.

- Sanchez, A.; Hernández, M.; Luna, J.; Moyano, G.; Villanueva, M.; Muñóz, E. 2001. Riesgos de residuos en leche debidos a tratamientos indebidos. XVIII Reunión de especialistas en control de mastitis y calidad de leche (G-Temcal). Lisboa, Portugal.
- Saran, A. 1995. Intrammary and systematic antibiotic mastitis treatment in lactating and dry cows. *In* Residues of antimicrobial drugs and other inhibitor in milk. IDF. S.I. N° 9505: 85-96. International Dairy Federation. Bruselas, Belgica.
- Sarmah, A.; Meyer, M.; Boxall, A. 2006. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere*. 65: 725-759.
- SAS® Institute Inc. 2001. SAS Users guide: statistics version 9.1. Cary, NC.
- Sawant, A.; Sordillo, L.; Jayarao, B. 2005. A survey on antibiotic usage in dairy herds in Pennsylvania. *J. Dairy Sci.* 88: 2991-2999.
- Saville, W.; Wittum, T.; Smith, K. 2000. Association between measures of milk quality and risk of violative antimicrobial residues in grade-A raw milk. *JAVMA*. 217: 541-545.
- Scannella, D.; Neaves, P.; Keedy, K.; Bell, C. 1997. An evaluation of the delvo x- press β L test for detecting β - lactams in Ex-farm raw Milks. *Dairy J.* 7: 93-96.
- Schliephake, A. 1996. Optische Dichtemessung des Wachstums Ausgewählter Bakterienstämme unter Hemmstoffeinfluß. Tesis Doctoral Escuela Superior de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Hannover, Alemania. 181pp.
- Schwartz, H.; Sher, T. 1984. Anaphylaxis to penicillin in a frozen dinner. *Ann. Allergy*. 52: 342-343.
- SENASA (Servicio de Sanidad y Calidad Agroalimentaria). 1999. Decreto 815/1999. 24 de julio 1999. pp. 14.
- SENASA (Servicio de Sanidad y Calidad Agroalimentaria). 1999, 2000. Normativa UE Tambos UE4, UE5, UE6. Parte de Supervisión. pp. 10-21.
- SENASA (Servicio de Sanidad y Calidad Agroalimentaria). 2001. Dirección de Agroquímicos y Productos Farmacológicos y veterinarios. Coordinación Gral. de Productos Farmacológicos Veterinarios y Alimentos para Animales. Prohibiciones y Restricciones en la utilización de drogas en medicina veterinaria. Disponible en: <http://www.senasa.gov.ar/agro/prohibiciones>.
- SENASA (Servicio de Sanidad y Calidad Agroalimentaria). 2003. Dirección de Agroquímicos, Productos Farmacológicos y veterinarios. Decreto 256/2003. Disponible en <http://www.senasa.gov.ar/contenido.php?to=n&in=1033&io=4379>.

SENASA (Servicio de Sanidad y Calidad Agroalimentaria). 2008. Plan Anual 2008 de Residuos y Toxinas en alimentos de origen animal. Plan CREHA 14/03/2008. Pp. 6. Disponible www.senasa.gob.ar/archivo/File/File1257-Plan%20Creha.pdf.

SENASA (Servicio de Sanidad y Calidad Agroalimentaria). 2009. Resolución n° 63/2009. 28 de enero de 2009. Plan Nacional de Residuos Químicos en Productos y Subproductos y Derivados de Origen Animal. pp 2. Disponible en www.senasa.gob.ar/contenido.php?to=n&in=1334&ino=1334&io=9146.

Senyk, G.; Davisodson, J.; Brown, J.; Hallstead, E.; Sherbon J. 1990. Comparasion of rapid test used to detect antibiotic in milk. J. Food Prot. 53: 158-164.

Seymour, E.; Jones, G.; Gilliard, M. 1998. Comparisons of on-farm screening test for detection or antibiotics residues. J. Dairy Sci. 71: 539-544.

Shiffmann, A.; Schütz, M.; Wiesner, H. 1992. False negative and positive results in testing for inhibitory substances in milk. Factors influencing the brilliant black reduction test (BRT®). Milchwissenschaft. 47: 770-772.

Shitandi, A.; Sternejo, A. 2004. Factors contributing to the occurrence of antimicrobial drug residues in Kenyan milk. J. Food Prot. 67: 399-402.

Sischo, W.; Burns, C. 1993. Field trial of four cowside antibiotic residue screening test. JAVMA. 202: 1249-1254.

Sischo, W. 1996. The issue of testing quality. Symposium drug residue avoidance. J. Dairy Sci. 79: 1065-1073.

Smink, D. 1979. A standard test for the detection of antibiotic residues in milk. North European Dayry J. 3: 7-8.

Spisso, B.; De Oliveira, E.; Jesus, A.; Gonçalves De Araújo, M.; Monteiro, M. 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.

Sternesjo, A.; Johnsson, G. 1998. A novel rapid enzyme immunoassay (Fluorophos Beta screen) for detection of β -lactam residues in exfarm raw milk. J. Food Prot. 61: 808-811.

Suhren, G.; Heeschen, W.; 1993. Detection of tetracyclines in milk by a *Bacillus cereus* microtitre test with indicator. Milchwissenschaft, 48: 259-263.

Suhren, G.; Heeschen, W. 1994. Proficiency study of microbial inhibitor test. Milchwissenschaft. 49: 629-633.

- Suhren, G. 1995. Possibilities and limitations of microbiological inhibitor test. 159-171. *In Residues of Antimicrobial Drugs and Other Inhibitors in Milk*. IDF S.I. N° 9505. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica.
- Suhren, G.; Reichmuth, J.; Walte, H. 1996. Detection of β -lactam antibiotics in milk by the penzym-test. *Milchwissenschaft*. 51: 269-273.
- Suhren, G.; Beukers, R.; Reichmuth, J. 1997. Guidance for the standardized description of microbial inhibitor test. Reporte IDF 16 pp. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica.
- Suhren, G.; Beukers, R. 1998. Delvotest SP for detection of cloxacillin and Sulfamethoxazole in milk: IDF Interlaboratory Study. *J. AOAC Int.* 81: 978-989.
- Suhren, G.; Reichmuth, J. 1998. Nachweis von β -laktamantibiotikarückständen in milch-Erfahrungen mit dem SNAP-Beta-Laktamtest. *D.M.Z. Lebensmittelindustrie und Milchwissenschaft*. 119: 674-681.
- Suhren, G. 2002. Hemmstoffe und Tierarzneimittelrückstände in milch-rechtliche Grundlagen, Nachweisverfahren, Untersuchungssysteme. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*. 54: 35-71.
- Suhren, G.; Walte, H. 2003. Experiences with the application of method combinations for the detection of residues of antimicrobial drugs in milk from collecting tankers. *Milchwissenschaft* 58: 536-540.
- Sullivan, T.; Wedner J.; Shatz, G.; Yecies, L.; Parker, C. 1981. Skin testing to penicillin allergy. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 68: 171-180.
- Sumano, H.; Ocampo, L. 1997. Quimioterapia de las enfermedades microbianas. 118-137. *In Farmacología Veterinaria*, 2ª ed. Ed. McGraw-Hill Interamericana. Madrid, España.
- Tollefson, L.; Karp, B. 2004. Human health impact from antimicrobial use in food animals. *Méd. Mal. Infec.* 34: 514-521.
- Tramontin, S.; Bonato, P.; Spolaor, D. 1992. Uso di un metodo immunoenzimatico per la ricerca rapida degli antibiotici nel latte. Istituto Lattiero Caseario e di Biotecnologie Agroalimentari. Thiene, Vicenza, Italy.
- Triton, T. 1977. Ribosome-Tetracycline Interactions. *Biochemistry*. 16: 4133-4138.
- Tsai, C.; Kondo, F. 2001. Improved agar difusión method for detecting residual antimicrobial agents. *J. Food Prot.* 64: 361-366.

Tyler, J.; Cullor, J.; Erskine, R.; Smith, W.; Dellinger, J.; Macclure, K. 1992. Milk antimicrobial drug residue assay results in cattle with experimental, endotoxi-induced mastitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 210: 1378-1384.

USDA-FSIS (United States Department of Agriculture-Food Safety and Inspection Service). 2007. Laboratory guidebook chapter 34.2. http://www.fsis.usda.gov/PDF/MLG_34_02.pdf.

Van Eenennaam, A.; Cullor, J.; Perani, L.; Cradner, Y.; Smith, W.; Dellinger, J.; Guterbock, W. 1993. Evaluation of milk antibiotic residue screening test in cattle with occurring clinical mastitis. *J. Dairy Sci.* 76: 3041-3053.

Van Os, J.; Beukers R. 1980. A multitest system for detection of antibiotics in milk. *J. Food Prot.* 43: 510-511.

Van Rhijn, J.; Lasaroms, J.; Berendsen, B.; Brinkman, U. 2002. Liquid chromatographic-tandem mass spectrometry determination of selected sulphonamides in milk. *J. Chromatogr.* 960: 121-133.

Van Schaik, G.; Lotem, M.; Schukken, Y. 2002. Trends in somatic cell counts, bacterial counts, and antibiotic residue violations in NewYork state during 1999-2000. *J. Dairy Sci.* 85: 782-789.

Van Schothorst, M. 1969. Residuen van antibiotica in slachtdieren (Antibiotic residues in slaughter animals). Tesis doctoral. University of Utrecht, The Netherlands. pp. 245

Vera Candiotti, L. 2009. Desarrollo de nuevas estrategias analíticas basadas en técnicas separativas acopladas a metodologías de pre-concentración y modelado quimiométrico para el análisis de fármacos y sus metabólicos en muestras complejas. Tesis Doctoral. Universidad Nacional del Litoral, Argentina. 237 pp.

Vermunt, A.; Stadhouders, J.; Loefeen, G.; Bakker, R. 1993. Improvements of the tube diffusion method for detection of antibiotics and sulfonamides in raw milk. *Neth. Milk Dairy J.* 47: 31-40.

Veterindustria. 2006. Guía de productos zoonosanitarios 2005-2006. 9ª ed. Ed. Veterindustria. Madrid, España.

Viñas, P.; López Erroz C., Campillo N., Hernández-Córdoba M. 1996. Determination of sulphonamides in foods by liquid chromatography with postcolumn fluorescence derivatization. *J. Chromatogr.* 726: 125-131.

- Volmer, D. 1996. Multiresidue determination of sulphonamide antibiotics in milk by short-column liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 10: 1615-1620.
- Wen, Y.; Zhang, M.; Zhao, Q.; Feng, Y. 2005. Monitoring of five sulphonamide antibacterial residues in milk by in-tube solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 53: 8468-8473.
- Yang, T.; Yang, I.; Liao, L. 2004. Determination of sulphonamide residues in milk by on-line microdialysis and HPLC. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 27: 501-510.
- Zaadhof, H.; Maltbauer, A.; Vormeiter, A.; Schweizer, L. 1997. Zureignung kommerzieller mikrobiologischer hemmstofftests als suchverfahren auf das vorhandensein von antiinfektiva in milch und erzeugnissen auf milchbasis. *Archiv für Lebensmittelhygiene.* 48: 132-144.
- Zeng, S.; Escobar, E.; Brown-Crowder, Y. 1996. Evaluation of screening test for detection of antibiotics residues in goat milk. *Small Ruminant Res.* 21: 155-160.
- Zeu-Inmunotec. 2003. Screening Plus. Informe técnico. Ed. ZEU-Inmunotec S. L. Zaragoza, España.
- Zhang, C.; Liu, Y.; Men, L.; Wang, S. 2005. Identification of residual tetracyclines in milk by electrospray high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Chinese J. Vet. Sci.* 25: 649-654.
- Zhao, F.; Zhang, X. ; Gan, Y. 2004. Determination of tetracyclines in ovine milk by high-performance liquid chromatography with a coulometric electrode array system. *J. Chromatogr. A.* 1055: 109-114.
- Zomer, E. ; Lieu, T. 1995. AIM-96, a broad spectrum antimicrobial drug inhibition monitoring assay: advantages and enhancement of an integrated monitoring system. 192-194. In *Residues of antimicrobial drugs and other inhibitors in milk.* IDF S.I. N° 9505. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica.
- Zorraquino, M. 1996. Aplicación de un sistema de análisis de riesgos y puntos críticos para asegurar una leche libre de residuos de medicamentos veterinarios. XIII Jornadas del Grupo de Técnicos especialistas en Mamitis y Calidad de la Leche. Pamplona, España.
- Zorraquino, M. 1997. Niveles de residuos de medicamentos veterinarios en leche por debajo de los límites máximos de residuos de la UE. XIV Jornadas del Grupo de Técnicos especialistas en Mamitis y Calidad de la Leche. Palma de Mallorca, España.

Zorraquino, M. 1998. Límites de detección del método BRT en leche de vaca. Conferencia XV Jornadas del Grupo de Técnicos especialistas en Mamitis y Calidad de la Leche. Lugo, España.

Zorraquino, M. 2005. Inactivación térmica de sustancias antimicrobianas en leche. Tesis Doctoral. Universidad Pública de Navarra, España. pp. 144

Zorraquino, M.; Berruga, M.; Molina, M. 2007. Investigación de campo de los antibióticos (principio activo-formulación) utilizados en vacuno de leche en España y patología tratada. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid, España. 73 pp.

Zorraquino, M. 2008. Investigación de campo sobre tratamientos antimicrobianos en vacuno de leche en procesos patológicos no mamíticos. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid, España. 115 pp.

Zorraquino, M.; Roca, M.; Castillo, M.; Althaus, R.; Molina, M. 2008a. Effect of thermal treatments on the activity of quinolones in milk. *Milchwissenschaft*. 63: 192-195.

Zorraquino, M.; Roca, M.; Fernandez, N.; Molina, M.; Althaus, R. 2008b. Heat inactivation of beta-lactam antibiotics in milk. *J. Food Prot.* 71: 1193-1198.

Zorraquino, M.; Althaus, R.; Roca, M.; Molina, M.P. 2009. Effect of Industrial Heat Treatments on the Antimicrobial Activity of Aminoglycosides in Milk. *J Food Prot.* 72: 1338-1341.

Zwald, A.; Ruegg, P.; Kaneene, J.; Warnick, L.; Wells, S.; Fossler, C.; Halbert, L. 2004. Management practices and reported antimicrobial usage on conventional and organic dairy farms. *J. Dairy Sci.* 87: 191-201.