UTILIZACIÓN DE TESTS DE CRIBADO PARA LA DETECCIÓN DE RESIDUOS ANTIBIÓTICOS EN LECHE DE OVEJA

Berruga[1] M.I., M. Yamaki[1], B. Novés[2], R.L. Althaus[3], M.P. Molina[4] y A. Molina[1]

[1]Departamento de Ciencia y Tecnología Agroforestal, ETSIA, Universidad de Castilla-La Mancha, 02071 Albacete.
[2]Sección Sanidad Animal, Instituto Técnico Agronómico Provincial (ITAP), Diputación Provincial de Albacete, 02080 Albacete.
[3]Cátedra de Biofísica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral, 3080 Esperanza, Argentina.
[4]Departamento de Ciencia Animal, Universidad Politécnica, 46071 Valencia.

INTRODUCCIÓN

En la leche de oveja la presencia de residuos puede tener graves implicaciones en la salud pública y en los procesos tecnológicos de la industria láctea. Para la detección de estos residuos, se han evaluado varios tests de cribado comercializados para leche de vaca, cuyos resultados han demostrado una sensibilidad aceptable en leche de oveja (*1, 2, 3, 7*), con límites de detección incluso inferiores a los Límites Máximos de Residuos (LMR) establecidos por la UE (*4*). Este trabajo pretende evaluar el comportamiento de diversos métodos de cribado durante la eliminación de dos β-lactámicos administrados a ovejas en lactación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para este estudio, 24 ovejas de raza Manchega, en su cuarta semana de ordeño y procedentes del rebaño experimental del ITAP, se distribuyeron en 2 lotes homogéneos que fueron tratados con ampicilina (Amfipen LA, Intervet) y amoxicilina (Clamoxyl LA, Pfizer), respectivamente. Cada tratamiento consistió en la administración de 2 inyecciones intramusculares de 15 mg de antibiótico/kg PV con un intervalo de 48 horas. Tras la última dosis, se recogieron muestras de leche procedentes del ordeño de la mañana y de la tarde durante 6 días, y se refrigeraron a 4ºC hasta su análisis (antes de 24 horas). El periodo de supresión recomendado por los fabricantes para ambos antibióticos es de 6 ordeños.

Todas la muestras se analizaron simultáneamente con 4 test de inhibición microbiológica: *BRT MRL* (AIM-Analytik in Milch Produktions-und Vertriebs BmbH), *Copan test (CH ATK) microplate P&S* (Chr Hansen), *Delvotest SP* (DSM Food Specialties) y *Eclipse 100ov* (ZEU-Inmunotec), y el test enzimático *Penzym 100* (Chr Hansen). Las condiciones de ensayo fueron las señaladas por cada fabricante, y las respuestas se evaluaron independientemente como positivas, dudosas o negativas por un panel entrenado de 3 personas mediante interpretación visual y según las mismas directrices.

Para evaluar la influencia del número de ordeño y de la producción de leche sobre las respuestas de los 5 métodos, se utilizó un modelo de regresión logística multinomial. El análisis estadístico para estudiar los efectos de los factores sobre la respuesta de los 5 métodos se realizó empleando el siguiente modelo: $\mathbf{L_{ijk} = logit\ [P_{ijk}] = \beta_0 + \beta_1\ [NO]_i + \beta_2\ [PL]_j + \varepsilon_{ijk}}$; donde L_{ijk} es la variable dependiente; $[P_{ijk}]$ es la probabilidad de la respuesta categórica ("positivo/dudoso + negativo" o "dudoso + positivo/negativo"); β_0 es el intercept; β_1, β_2 son los parámetros estimados para el modelo; $[NO]_i$ es el efecto del número de ordeño (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 12); $[PL]_j$ es el efecto de la producción de leche y ε_{ijk} es el error residual. Dicho estudio se realizó utilizando la opción STEPWISE del procedimiento LOGISTIC contenido en el paquete estadístico SAS (1998).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de la aplicación del modelo logístico a las respuestas de los métodos de cribado para los dos tratamientos se resumen en la Tabla 1 y Figura 1. Para ambos tratamientos y todos los métodos ensayados el ajuste de la función matemática presentó elevados coeficientes de concordancia (C>86%; Tabla 1), aunque sólo resultó significativo el efecto del número de ordeño (P<0,0001).

En el caso de la **ampicilina** los métodos Eclipse 100ov, BRT MRL y Delvotest SP presentaron mayores pendientes ("β_1", Tabla 1); es decir, una más rápida disminución en la respuesta de estos métodos. Por otro lado, los métodos BRT MRL y Delvotest SP mostraron una elevada frecuencia de casos dudosos (Fig. 1), en concordancia con el parámetro "β_{01} - β_{02}", cuyos valores fueron más elevados en estos métodos ("16,6004–10,0290" y "11,2768–7,7846", respectivamente), lo que podría atribuirse al hecho de que al finalizar el periodo de supresión coinciden los límites de detección de los métodos ensayados con el LMR. Respecto a los casos positivos, casi no se observan en el séptimo ordeño, a excepción del Penzym 100 (7%). Hay que destacar la sensibilidad de los métodos ensayados presentando valores próximos al LMR (4 ppb;*4*); entre 3 ppb para Delvotest SP (*3*) y BRT MRL (*6*), y 4 ppb para Eclipse 100ov (*7*), Penzym 100 (*1*) y CH ATK P&S (*5*).

También para la **amoxicilina**, los métodos Eclipse 100ov y Delvotest SP presentaron mayores valores de "β_1". En este tratamiento, Eclipse 100ov, Delvotest SP y Penzym 100 mostraron mayor frecuencia de casos dudosos. Tras los 6 ordeños de supresión recomendados por el fabricante, todavía se observaron elevadas frecuencias de respuestas positivas (73,4% CH ATK P&S, 51,7% BRT MRL, 28,4% Penzym 100 y 11,3% Delvotest SP). Los límites de detección para los métodos BRT MRL y CH ATK P&S fueron 2 –3 ppb (*6*) y 3,5 ppb (*5*), respectivamente, motivo por el cual es posible detectar sus residuos después de finalizado el periodo de supresión; mientras que Eclipse 100ov presenta menor sensibilidad a amoxicilina (7 ppb; *2*), motivo por el que la frecuencia de positivos resultó muy baja al finalizar el periodo de seguridad (2,8%). Para Delvotest SP (*3*) y Penzym 100 (*1*), el límite de detección (5 ppb) está próximo al LMR (4 ppb;*4*) por lo que tras el tiempo de supresión se observa un alto porcentaje de casos dudosos (45,1% en Delvotest SP y 44,6% e Penzym 100).

Nuestros resultados sugieren la necesidad de ajustar la sensibilidad de los métodos de cribado a los LMR, ya que pese a que el ganadero respete el periodo de supresión, pueden encontrarse resultados positivos y dudosos en muestras de leche de oveja procedentes de animales individuales cuando se analizan con BRT MRL, Delvotest SP, CH ATK P&S y Penzym 100.

BIBLIOGRAFÍA

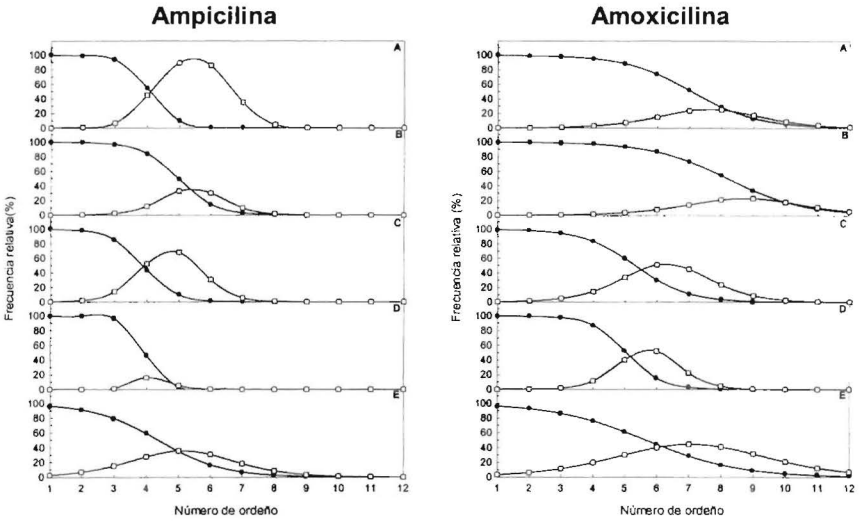
1. Althaus R, MP Molina, M Rodríguez y N Fernández. 2001. *J. Food Prot.* 64: 1844-1847.
2. Althaus RL, A Montero, MC Beltrán, R Lloría y MP Molina. 2002a. p 224-228. *En* Actas de XXVII Jornadas Científicas SEOC, Valencia, España, 19-21 septiembre.
3. Althaus RL, C Peris, A Montero, A Torres y P Molina. 2002b. *Milchwissenschaft*. In press.
4. Anón. 1999. Reglamento (CE) 508/99 por el que se modifican los anexos I a IV del Reglamento (CEE) 2377/90 del Consejo 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, p. 16-52. 4 marzo 1999, DOCE L60.
5. Anón. 2001. Copan test (CH ATK) antibiotic test instructions, CHR Hansen, Hoersholm, Dinamarca.
6. Anón. October 2002. Detection sensitivity of the AIM BRT-Tests towards selected antibiotics in µg/kg (ng/mol; ppb). Disponible en: http://www.aim-bayern.de/english/information/detectionm.htm. Consultado en 28 octubre 2002.
7. Molina P, A Montero, E Gomis, RL Althaus y A Molina. 2001. *En* Actas de la XVIII Reunião G-Temcal "Segurança nos lacticíneos. Control na exploração", Lisboa, Portugal, 28-29 septiembre.

Tabla 1. Coeficientes del modelo de regresión logística para la eliminación de ampicilina y amoxicilina en leche de oveja.

	Métodos	β_{01} [a]	β_{02} [b]	β_1	C [c]
Ampicilina	BRT MRL	10,6290	16,6004	-2,4580	94,7%
	CH ATK P&S	8,5030	10,0424	-1,7080	96,5%
	Delvotest SP	7,7846	11,2768	-2,0065	95,0%
	Eclipse 100ov	13,6978	14,4512	-3,3116	98,4%
	Penzym 100	4,2916	5,7963	-0,9826	91,5%
Amoxicilina	BRT MRL	6,8887	7,9490	-0,9742	92,3%
	CH ATK P&S	6,9055	7,8484	-0,8418	90,1%
	Delvotest SP	6,5344	8,8514	-1,2277	94,2%
	Eclipse 100ov	9,2268	11,6771	-1,8235	96,6%
	Penzym 100	3,9108	5,8315	-0,6905	86,7%

[a] $\beta_{01} = \beta_0$ se usa para estimar la frecuencia de casos "positivos/dudosos + negativos"; [b] $\beta_{02} = \beta_0$ se usa para estimar la frecuencia de casos "positivos + dudosos/negativos"; [c] C: Coeficientes de concordancia.

Figura 1. Frecuencia relativa de casos positivos (●) y dudosos (□) en leche de ovejas tratadas por vía intramuscular con ampicilina o amoxicilina utilizando los métodos BRT MRL (A), CH ATK P&S (B), Delvotest SP (C), Eclipse 100ov (D) y Penzym 100 (E).



Agradecimientos.- Este trabajo ha sido financiado por el Proyecto 191/IA-40 de la Conserjería de Agricultura y Medio Ambiente (JJ CC Castilla-La Mancha). Se agradece a las empresas AIM-Analytik in Milch Produktions-und Vertriebs GmbH (Alemania), Chr Hansen (Dinamarca), DSM Food Specialties (Holanda) y ZEU-Inmunotec (España) la colaboración en este trabajo mediante la donación de los test que han permitido su realización.