

Colegio de Ingenieros del Perú CD Cusco



Cusco, 25 de junio de 2024

Presencia de antibióticos en la leche: un problema de salud global

M^a Pilar Molina Pons

Catedrática de Universidad

Departamento de Ciencia Animal

Universidad Politécnica de Valencia.

46071 Valencia



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA

E-mail: pmolina@dca.upv.es

UNA UNIVERSIDAD PARA VIVIR



<http://www.upv.es>



3ª ciudad española

Ciudad de Valencia + Área metropolitana:
1.446.307 hab.

Excelente clima



Formamos personas,
formamos profesionales.

líderes del futuro.



29.000 estudiantes

39% mujeres/9%
extranjeros

+ **2.600** profesores e
investigadores

1.500 profesionales no
académicos



41 grados / dobles grados

84 másteres / dobles
másteres

cerca de **30** doctorados
(**260** Tesis defendidas)



4.500 personas en I+D

95M€ en ingresos por
Investigación y
Transferencia

2.200 artículos en
revistas indexadas en Web
of Science





Escuela
técnica
superior de
**ARQUI
TECTURA**

Escuela técnica
superior de
**INGENIERÍA DEL
DISEÑO**

Escuela técnica
superior de
**INGENIERÍA
GEODÉSICA,
CARTOGRÁFICA
Y
TOPOGRÁFICA**

Escuela técnica
superior de
**INGENIEROS DE
TELECOMUNICACIONES**

Escuela técnica
superior de
**INGENIEROS
INDUSTRIALES**

Escuela técnica
superior de
**INGENIERÍA de la
EDIFICACIÓN**

Escuela
técnica
superior de
INFORMÁTICA

Escuela
Técnica
Superior
de Ingeniería
**AGRONÓMICA
Y DEL MEDIO
NATURAL**

Facultad de
**BELLAS
ARTES**

Facultad de
**ADMINISTRACIÓN
Y DIRECCIÓN
DE EMPRESAS**

Escuela técnica
superior de
**INGENIEROS DE
CAMINOS,
CANALES Y
PUERTOS**

Escuela
Politécnica
Superior de
GANDIA

Escuela
Politécnica
superior de
ALCOY

14 Escuelas y Facultades
42 Departamentos
44 Entidades Investigación
30 Programas de Doctorado



2711 Estudiantes

337 Profesores (85% doctores)



Escuela
Técnica
Superior
de Ingeniería
AGRONÓMICA
Y DEL MEDIO
NATURAL

- Máster Ingeniería Agrónomica
- Máster en Ingeniería de Montes
- Master en Ganaderia de Precisión
- Máster en Enología
- Máster en Paisaje e Ingeniería Bioambiental

- Grado en Biotecnología
- Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos
- Grado en Ingeniería Agroalimentaria y del Medio Rural
- Grado en Ingeniería Forestal y del Medio Natural

GRADO

MÁSTER

TESIS

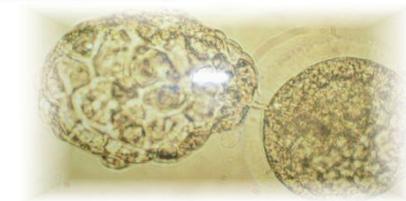


Instituto de Ciencia y Tecnología Animal



Grupos de Investigación

- **Grupo de Alimentación Animal**
- **Grupo de Investigación en Recursos Acuícolas**
- **Grupo de Mejora Animal**
- **Grupo de Sistemas y Tecnologías de la Producción Animal (STEPA)**



Grupo de Investigación STEPA

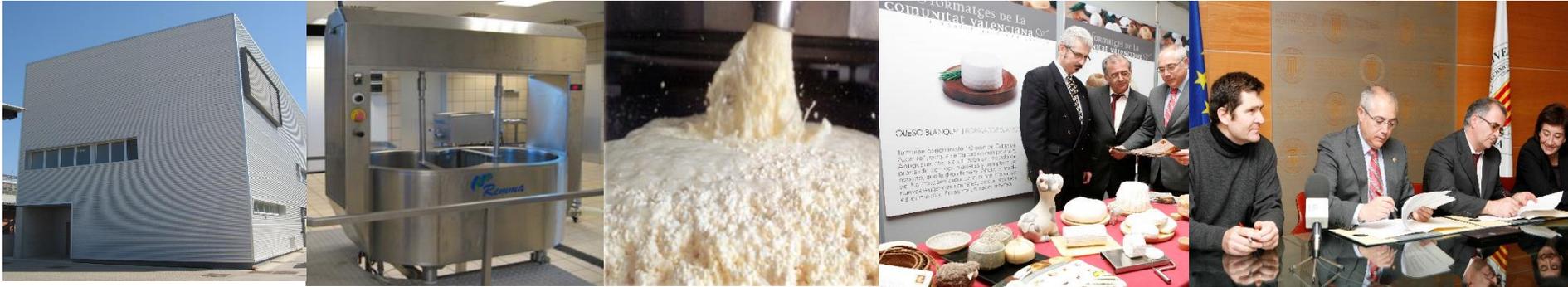
- **Ganadería y Medio Ambiente**
- **Tecnología del ordeño mecánico**
- **Ordeño mecánico y mamitis**
- **Sistemas de Producción en pequeños rumiantes**
- **Calidad, residuos y contaminantes de la leche**





2012

Planta Piloto de Elaboración de Quesos- *Caseus* Univesitat Politècnica de Valencia



Efectos de diferentes tratamientos tecnológicos sobre la elaboración de productos lácteos de leche de cabra (Quesos Valencianos)



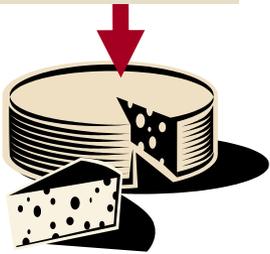


Bienvenidos

Calidad de la leche



Leche



Productos
lácteos

*Sanos
Saludables
Inocuos
Nutritivos*

- ❑ ***Calidad Organoléptica:***

Olor, sabor, aroma,...

- ❑ ***Calidad Bioquímica:***

Físico-química y composición

- ❑ ***Calidad Higiénico-Sanitaria:***

Bacteriología, RCS, **Inhibidores**,...

- ❑ ***Calidad Ética:***

Bienestar animal, Medio ambiente,...

Normativa UE:

Reglamento (CE) nº 852, 853/2004: Higiene alimentos (general y origen animal)

Reglamento (CE) nº 854/2004: Controles

Reglamento (CE) nº 882/2004: Controles

Inhibidores en la leche



CALIDAD



Sustancias que puede contener la leche que provocan la muerte o la inhibición de los microorganismos

- ❑ **Inhibidores naturales**
 - **Proteínas (lactoperoxidasa, lactoferrina, lisozima, Ig...)**
 - **Componentes de la leche (AGL,....)**
 - **Células somáticas**
- ❑ **Residuos de productos químicos**
 - **Residuos de medicamentos veterinarios**
 - **Restos de detergentes y/o desinfectantes**
 - **Residuos de plaguicidas, pesticidas, etc.**

Residuos de medicamentos veterinarios

- ❑ Antimicrobianos* (¡Los mas frecuentes!)
 - Antibióticos y Sulfamidas
 - Penicilinas, cefalosporinas, quinolonas, macrólidos, tetraciclinas, otros....
- ❑ Antiparasitarios*
- ❑ Antiinflamatorios*
- ❑ Acción sobre Sistema Nervioso Central
- ❑ Otros

* Sustancias que deben ser controladas en leche y derivados.
Reglamento CE 853/2004

Sustancias antimicrobianas

β -lactámicos

Penicilina
Ampicilina
Amoxicilina
Oxacilina
Cloxacilina
Ceftiofur
Cefalexina ...

Tetraciclinas

Oxitetraciclina
Clortetraciclina ...

Quinolonas

Enrofloxacin
Marbofloxacin ...

Nitrofuranos

Furazolidona...

Amnoglucósidos

Estreptomina
Neomicina
Gentamicina ...

Macrólidos

Tilosina
Espiramicina
Eritromicina ...

Fenicoles

Cloranfenicol
Tianfenicol ..

Nitroimidazoles

Ronadizol ..

Lincosamidas

Lincomicina ...

Sulfamidas

Sulfadiazol
Sulfametoxina ...

Y muchas más ...
Alrededor de unas 70 moléculas

Utilización de fármacos en Producción Animal

- Medicamentos veterinarios
 - ❑ Práctica generalizada
 - ❑ Necesarios en condiciones controladas
- Prescripción veterinaria
 - ❑ Vía de administración
 - ❑ Dosis de empleo
 - ❑ Tiempo de retiro/espera (periodo supresión)

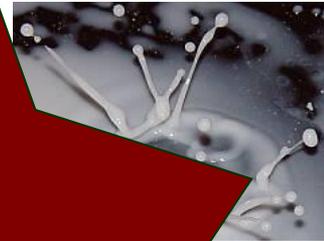


Residuos en animales y productos

Causas de la presencia de antibióticos en la leche

Prácticas ganaderas incorrectas

Tratamientos de mastitis
clínica y terapias de se



Negligencia de

leche contaminada a tanque
de animales tratados
de tratamientos aplicados

Medicame

porizados
tratamiento "extra-label"
de terapias de secado

Periodos de supresión incorrectos

No leer prospecto
Desconocimiento periodo supresión
No respetar periodo seguridad

**NO
seguimiento de
Buenas
Prácticas
Ganaderas**

Residuos de antibióticos en la leche

¿Por qué son un problema?

Salud del consumidor: toxicológicos

- Aparición de reacciones alérgicas
- Alteraciones en la flora intestinal
- Desarrollo de resistencias bacterianas



Amoxicilina & Penicilina
40% alergias a medicamentos

Gamboa, 2009



Más usados en terapia O&C

Berruga et al., 2008a

Alteración microbioma intestinal **Resistencias microbianas**



↓ capacidad: asimilar Fe, digerir alimentos, producción moléculas esenciales

Pérez-Cobas et al., 2012

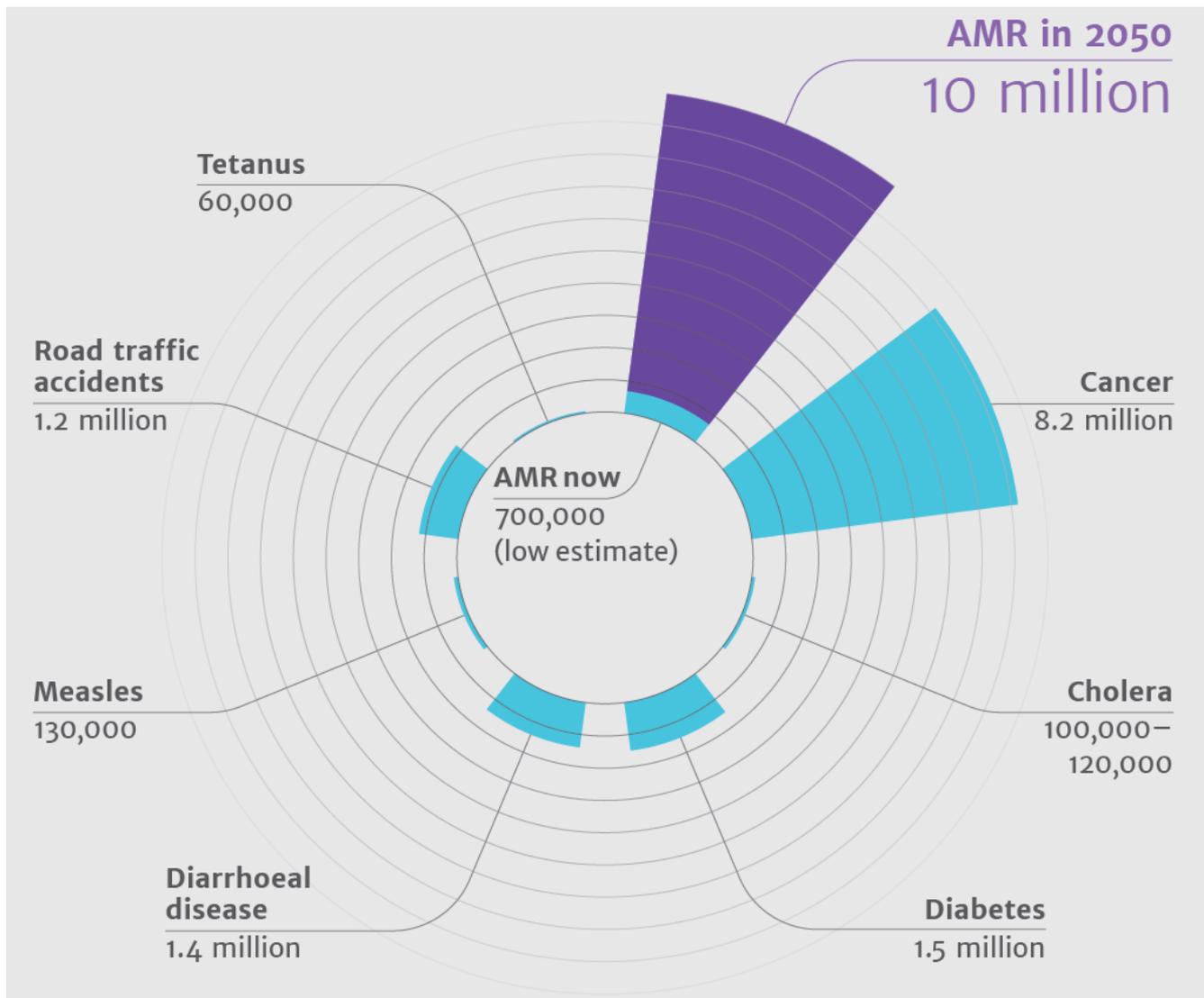


Philips et al., 2004

Resistencia a los antibióticos (antibioresistencia, RAM o AMR)

Magnitud del problema:

- ❑ La resistencia a los antibióticos es hoy una de las mayores amenazas para la salud mundial, la seguridad alimentaria y el desarrollo
- ❑ La resistencia a los antibióticos puede afectar a cualquier persona, sea cual sea su edad o el país en el que viva
- ❑ Cada vez es mayor el número de infecciones, por ejemplo neumonía, tuberculosis, gonorrea y salmonelosis, cuyo tratamiento se vuelve más difícil debido a la pérdida de eficacia de los antibióticos
- ❑ La resistencia a los antibióticos prolonga las estancias hospitalarias, incrementa los costos médicos y aumenta la mortalidad
- ❑ Cerca de 2.500 pacientes mueren cada año en España, UE 35,000 en la UE y 1,3 millones en el mundo a causa de bacterias resistentes. De mantenerse la tendencia en 2050 las muertes pueden llegar a 40.000 en España, 400,000 UE y 10 millones mundo superando al cáncer.



Review on Antimicrobial Resistance

Tackling drug-resistant infections globally

Resistencia a los antibióticos (antibioresistencia, RAM o AMR)

Algunas causas:

- ❑ Uso irracional de antibióticos para tratar procesos infecciosos en humanos.
- ❑ Uso amplio, constante y difundido de antibióticos entre especies animales destinadas a consumo humano, con el fin de curar, prevenir infecciones o bien, con fines de engorde.
- ❑ Hasta el 70% de la producción de antibióticos de importancia para los seres humanos en U.E., son empleados en animales.
- ❑ Diseminación global de bacterias multirresistentes a través del turismo, el comercio globalizado de alimentos contaminados y la migración de aves.
- ❑ No existe un estándar global en cuanto a la vigilancia a la resistencia antimicrobiana en la cadena de suministros alimentarios ni en el uso de medicamentos antimicrobianos.

Resistencia a los antibióticos (antibioresistencia, RAM o AMR)



GLOBAL ACTION PLAN ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE



Strategic objectives 8

Objective 1:

Improve awareness and understanding of antimicrobial resistance through effective communication, education and training 8

Objective 2:

Strengthen the knowledge and evidence base through surveillance and research 8

Objective 3:

Reduce the incidence of infection through effective sanitation, hygiene and infection prevention measures 9

Objective 4:

Optimize the use of antimicrobial medicines in human and animal health 10

Objective 5:

Develop the economic case for sustainable investment that takes account of the needs of all countries, and increase investment in new medicines, diagnostic tools, vaccines and other interventions 11

4º ASAMBLEA

ONU



HIGH-LEVEL MEETING ON
ANTIMICROBIAL RESISTANCE



21 SEPTEMBER 2016, UN HEADQUARTERS, NEW YORK

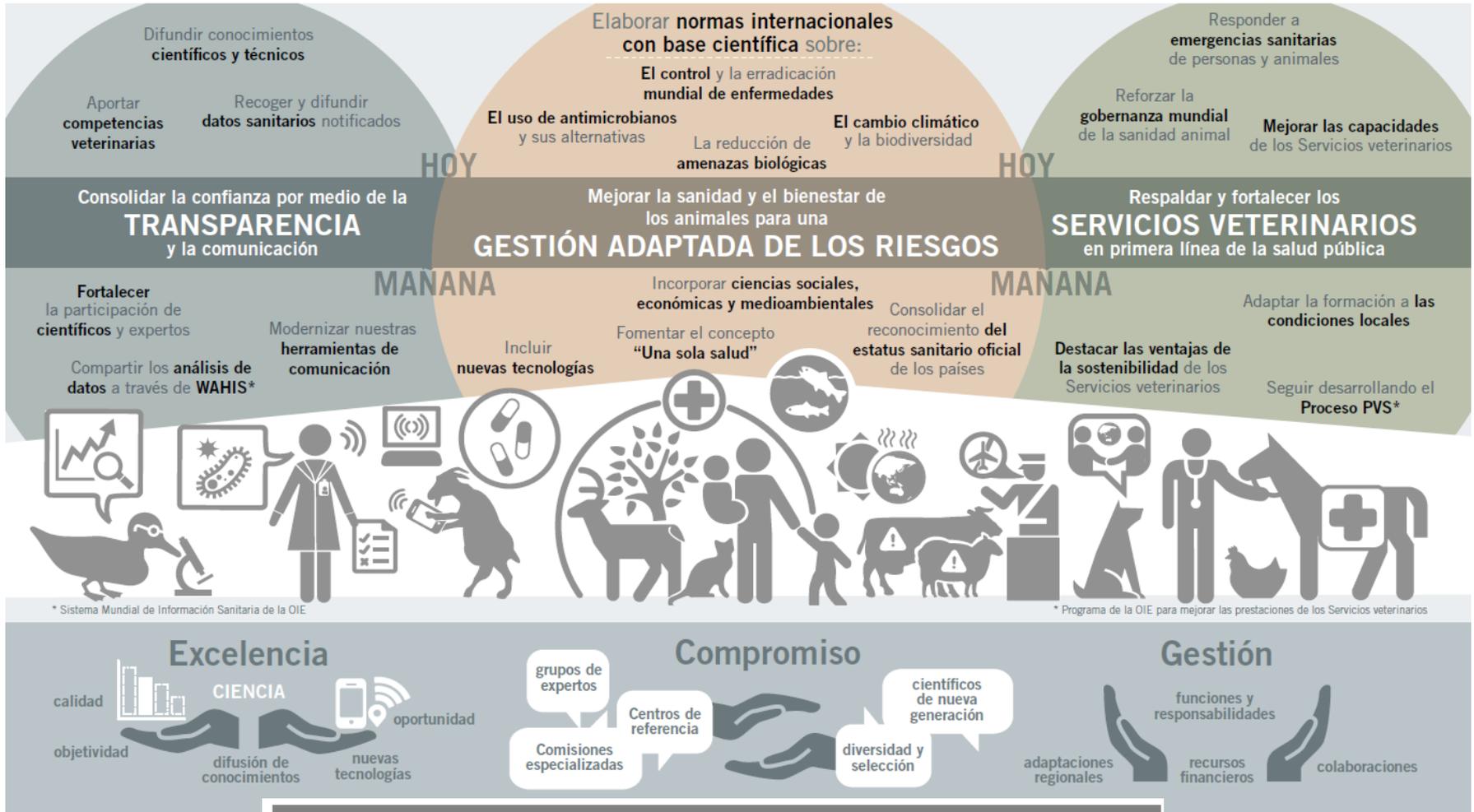
Compromiso de reducción de antibióticos como promotores del crecimiento
Promover el concepto de “Una salud” en la administración de antibióticos

El principio general para hacer frente a la resistencia es la promoción y la protección de la salud humana en el marco de “Una salud”, esto exige medidas multisectoriales coherentes, integradas y de amplio alcance, dados los vínculos entre la salud humana, animal y ambiental.



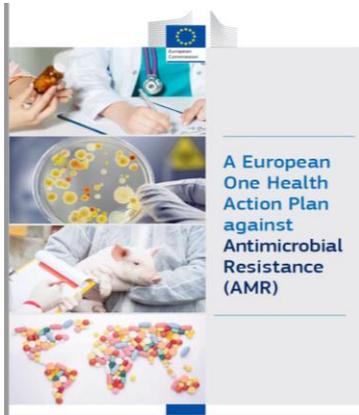
La OMS respalda la optimización del uso de los antimicrobianos en los humanos y los animales para mantener su eficacia, utilizando para ello el enfoque “Una salud”

6.º PLAN ESTRATÉGICO 2016-2020



SÉPTIMO PLAN ESTRATÉGICO DE LA OIE PARA EL PERIODO 2021-2025

Plan de Acción de la UE contra las resistencias microbianas (2011-2016, 2017-2022, 2023-2028)



Plan Nacional Resistencia Antibióticos



Plan Nacional Frente a la Resistencia a los Antibióticos 2022-2024

El uso de antibióticos en animales de granja ha disminuido en un 47% en promedio en toda Europa entre 2011 y 2021. En España, la reducción ha sido del 57%.

El objetivo es reducir el uso de antibióticos en animales de granja en un 30% para 2030.

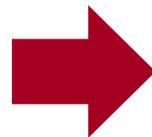
El uso de antibióticos en animales ha disminuido en toda Europa



47% on average
2011-2021



57% 2011-2021



118.3 mg/PCU
2018



PLAN MULTISECTORIAL PARA ENFRENTAR LA RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS EN PERU



Objetivos Estratégicos



Objetivo 1

- Mejorar la **concienciación** y la comprensión con respecto a la resistencia a los antimicrobianos a través de una comunicación, educación y formación efectivas

Objetivo 2

- Reforzar los conocimientos y la base científica a través de la vigilancia y la investigación

Objetivo 3

- Reducir la incidencia de las infecciones con medidas eficaces de saneamiento, higiene y prevención de la infección

Objetivo 4

- Utilizar de forma óptima los medicamentos antimicrobianos en la salud humana y sanidad animal

Objetivo 5

- Preparar argumentos económicos a favor de una inversión sostenible que tenga en cuenta las necesidades del país, y aumentar la inversión en nuevos medicamentos, medios de diagnóstico, vacunas y otras intervenciones

Comisión Multisectorial para enfrentar la resistencia a los antimicrobianos (CMS RAM)



Respuesta Mutisectorial y Multicisciplimar "Una Salud" ante las RAM

Plan Multisectorial para enfrentar la Resistencia a los Antimicrobianos 2024-2028



Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura



programa para el medio ambiente



Organización Mundial de la Salud



Organización Mundial de Sanidad Animal
Fundada como OIE

Semana mundial de concienciación sobre la resistencia a los antimicrobianos

18 - 24 de noviembre de 2023

Guía de campaña



Actividades por la Semana Mundial de la Concienciación sobre la Resistencia a los Antimicrobianos (WAAW)

18-24 noviembre 2023

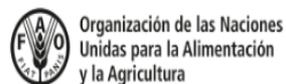
Comisión Multisectorial para enfrentar la Resistencia a los Antimicrobianos - Perú

3 de noviembre		
Webinar: Universidad Cayetano Heredia	https://imtavh.cayetano.edu.pe/ 7.00 – 9.00 pm	Modalidad virtual: Avances y retos en la implementación del PROA en latino américa
08 de noviembre		
FERIA INFORMATIVA INS	Explanada del Comedor Central – Campus UNSM SM 09.00 -01.00 pm	Módulo para charlas a la comunidad Feed-back con preguntas Juego "Tablero de memoria sobre uso de antimicrobianos", Ruleta antimicrobiana
10 de noviembre		
Webinar: Universidad Cayetano Heredia	https://imtavh.cayetano.edu.pe/ 3.00 – 5.00 pm	Modalidad virtual: Automedicación en Perú: análisis de una encuesta nacional
17 de noviembre		
Webinar: Universidad Cayetano Heredia	https://imtavh.cayetano.edu.pe/ 3.00 – 5.00 pm	Modalidad virtual: Resistencia a antibióticos, virulencia y tipificación molecular en <i>P. aeruginosa</i> aisladas de hemocultivos en periodos pre y post-pandemia
13 noviembre		
Radio Exitosa	Programa médicos en acción	Entrevista a infectólogo: Manuel Espinoza INS
20 de noviembre		
Simposio Veterinaria UPCH	Auditorio del Campus de la Universidad Cayetano Heredia, Av. Armendáriz 445 8:30 - 1:00 pm	Modalidad presencial: I Encuentro Nacional Académico sobre Resistencia a los Antimicrobianos - Proyecto "RAM-MPTF: Lucha contra la resistencia a los antimicrobianos en Perú bajo el enfoque de Una Salud"
21 - 22 de noviembre		
Foro DIGEMID: Lanzamiento de la Semana de la Concienciación 2023:	Hotel Iberostar Malecón 28 Julio 385, Miraflores. 8.00 – 13.00pm https://minsa-gob-pe.zoom.us/j/91913936786	Modalidad mixta: Foro internacional "Luchando contra la resistencia a los antimicrobianos en el Perú"
23 – 24 de noviembre		
Seminario CDC- Perú	Hotel Sol de Oro 8.00 am- 5.00 pm	Modalidad mixta: Seminario sobre la vigilancia prevención y control de las IAAS y resistencia antimicrobiana
24 de noviembre		
Webinar: Universidad Cayetano Heredia	UPCH 7.00 pm – 8.00 pm	Modalidad virtual: Epidemiología genómica de <i>Staphylococcus aureus</i> causantes de bacteremias en Sudamérica durante 2019
29 de noviembre		
Curso: INS	Sede Jesús María https://minsa-gob-pe.zoom.us/j/97036058062	Modalidad mixta: Panorama de la resistencia a los antimicrobianos bajo el enfoque Una Salud en Perú



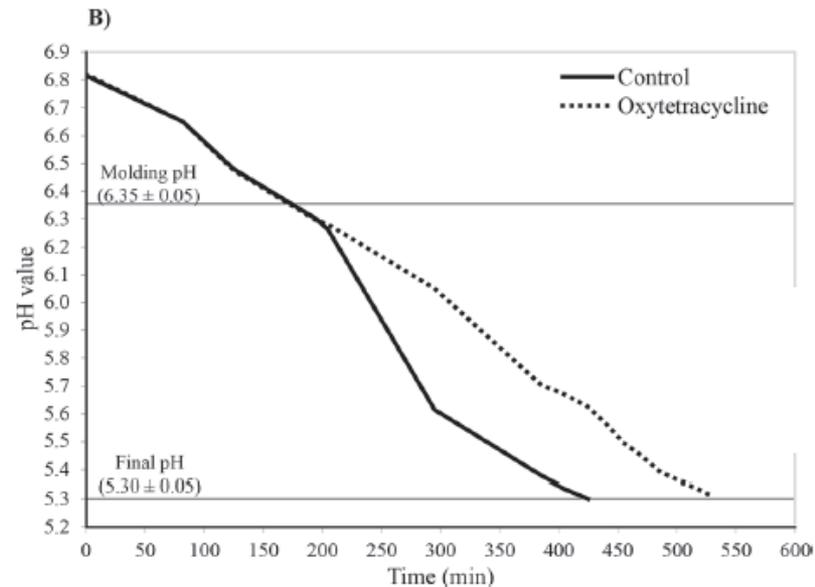
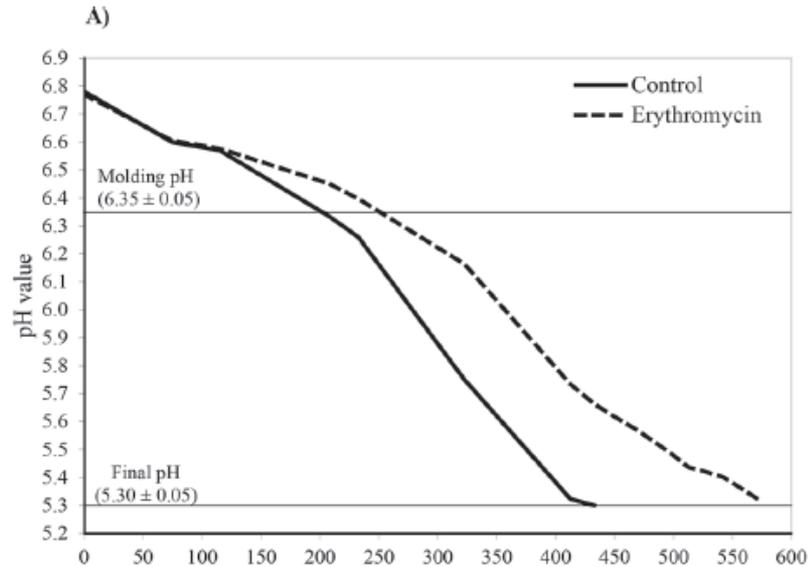
TRABAJANDO JUNTOS PARA COMBATIR LA RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS

Trabajando juntos para combatir la resistencia a los antimicrobianos



Fondo Fiduciario de Socios Múltiples (MPTF)
Proyecto RAM-MPTF “Lucha contra la RAM en el
Perú bajo el enfoque de Una Salud”

Efecto de los antibióticos en la leche y en el queso de cabra



Leche cruda de cabra
con antibióticos al LMR



Moldeo
pH= 6,30



Prensado 3.5 h
pH= 5.30 salado

Maduración
60 días

Figure 2. Kinetic acidification of the cheeses made from goat milk spiked with antibiotic during cheese-making: (A) erythromycin; (B) oxytetracycline.

QUINTANILLA ET AL.

Journal of Dairy Science Vol. 102 No. 4, 2019

Efecto de los antibióticos en la leche y en el queso de cabra

Table 1. Antibiotic concentration ($\mu\text{g}/\text{kg}$) in Tronchón cheese made from goat milk spiked with antibiotics at European Union maximum residue limit (EU MRL) concentration during ripening (mean \pm SD)

Antibiotic	EU MRL ¹ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Ripening time (d)		
		0	30	60
Amoxicillin	4	Tr ²	ND ³	ND
Benzylpenicillin	4	4.8 \pm 1.3	ND	ND
Cloxacillin	30	28.8 \pm 1.7	ND	ND
Erythromycin	40	21.8 \pm 1.0	ND	ND
Ciprofloxacin	100 ⁴	362.5 \pm 36.5	309.4 \pm 19.6	252.9 \pm 23.7
Enrofloxacin	100 ⁴	268.7 \pm 55.7	153.8 \pm 0.6	147.5 \pm 11.5
Oxytetracycline	100	432.3 \pm 31.9	140.6 \pm 15.4	20.0 \pm 5.7

¹European Union maximum residue limit in raw milk (European Union, 2010).

²Traces (limit of detection < result < limit of quantification).

³Not detected (result < limit of detection).

⁴Sum of enrofloxacin and ciprofloxacin.

**Presencia residuos
riesgo salud pública**



QUINTANILLA ET AL.

Journal of Dairy Science Vol. 102 No. 4, 2019

Efecto de los antibióticos en la leche y en el queso de cabra

Antibiótico LMR leche cruda (µg/kg)	Leche de cabra Pasteurizada		Queso fresco de cabra		
	A _L (µg/kg)	Reducción (%)	A _Q (µg/kg)	RQ	Retención (%)
<i>Betalactámicos</i>					
Amoxicilina 4	3.5 ± 0.5	12.8 ± 12.5	10.5 ± 2.3	19.5 ± 2.0	58.4 ± 10.9
Penicilina G 4	3.8 ± 0.3	4.2 ± 7.2	12.8 ± 2.2	20.0 ± 0.6	66.8 ± 12.4
Cloxacillin 30	27 ± 5.2	10.0 ± 17.3	109.2 ± 11.3	18.6 ± 0.9	75.2 ± 6.6
<i>Aminoglucosidos</i>					
Neomicina 1500	1195 ± 67.6	20.3 ± 4.5	3916.7 ± 495.7	19.1 ± 1.3	62.2 ± 4.5
<i>Macrolidos</i>					
Eritromicina 40	28.3 ± 3.4	29.2 ± 8.5	98.38 ± 5.9	19.0 ± 0.7	64.6 ± 3.9
<i>Quinolonas</i>					
Ciprofloxacina 100*	100 ± 0.0	0.0 ± 0.0	285.8 ± 12.8	20.1 ± 1.2	57.3 ± 4.5
Enrofloxacina 100*	96.6 ± 5.8	3.4 ± 5.8	250.9 ± 41.5	19.7 ± 0.5	51.1 ± 8.8
<i>Tetraciclinas</i>					
Oxitetraciclina 100	81.1 ± 13.9	18.9 ± 13.9	154.5 ± 57.9	19.6 ± 0.4	37.5 ± 14.9

Quintanilla et al., 2019. Characteristics of ripened Tronchón cheese from raw goat milk containing legally admissible amounts of antibiotics. J. Dairy Sci. 102: 2941-2953.

Residuos & Industria láctea

EFFECTOS TECNOLÓGICOS-ECONÓMICOS

- Inhibición bacteriana
(¡fallan las fermentaciones!)
- Características organolépticas del producto
(sabor, aroma, textura)
- Enmascaramiento de los controles microbiológicos
(¡fallan los controles!)
- Termorresistencia
(¡superan barreras térmicas!)
Ej. pasteurización, UHT,...



Residuos & Ganadero

EFFECTOS ECONÓMICOS

- Sanciones
- Inmovilización
- Destrucción de leche
- Contaminación en “cadena”

Residuos & Salud pública

EFFECTOS TOXICOLÓGICOS

- Alergias
- Resistencias microbianas
- Toxicidad
- Efectos sobre la flora intestinal

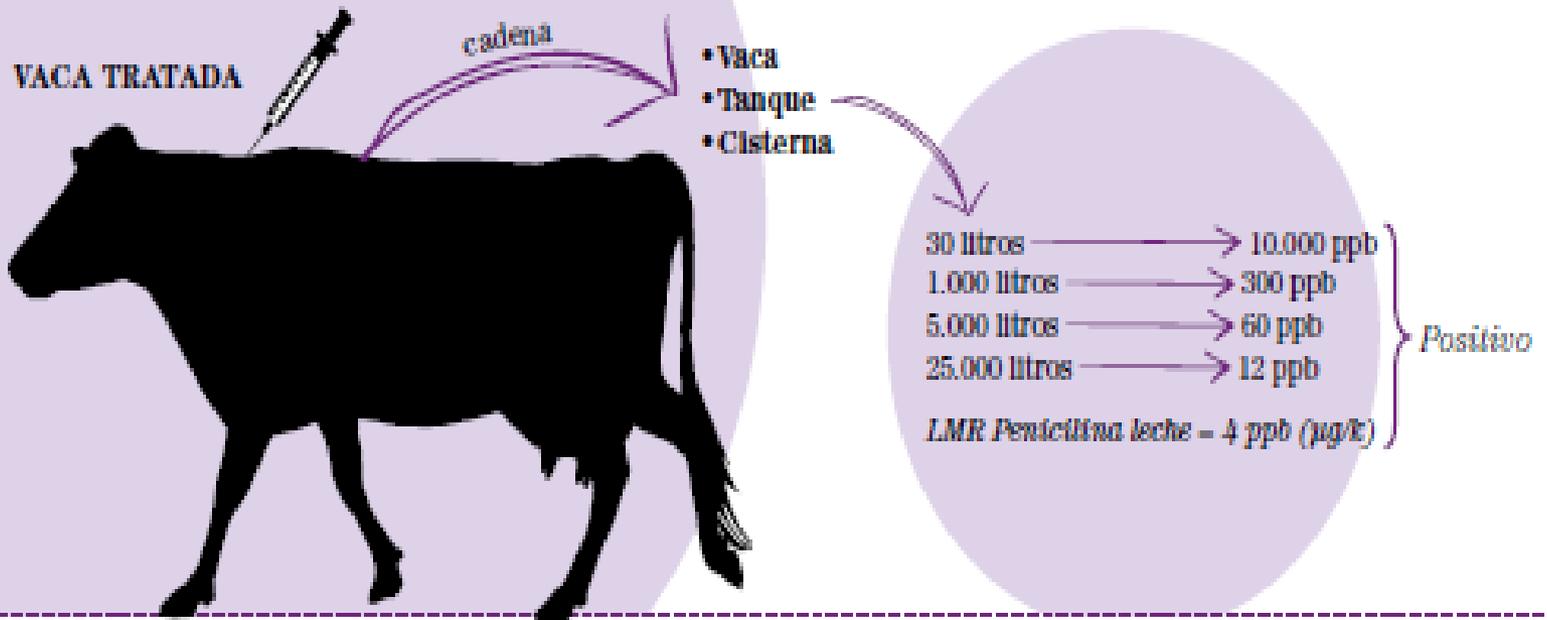


¿Por qué es importante el control de residuos antimicrobianos en leche?



CONTAMINACIÓN "EN CADENA"

Ejemplo. Vaca tratada 5.000.000 UI (3.000 mg) Penicilina G sódica IM
(se supone una eliminación en leche del 10%)



Reglamento (CE) n. 1774/2002: Material de categoría 2

- Eliminados directamente como residuos mediante incineración
- Transformación y después eliminación mediante incineración

SANDACH 2: Comisión Nacional de Subproductos Animales No Destinados A Consumo Humano



25.000 L x 0.40 € + análisis + transporte + destrucción

El mejor modo para evitar un positivo a antibiótico es:

BPGs

Prevención

- ❑ Programas sanitarios dirigidos a la prevención
- ❑ Chequeos periódicos de todas los animales con el fin de detectar cualquier signo de enfermedad
- ❑ Atención rápida y apropiada de los animales enfermos
- ❑ Aislamiento de animales enfermos y separación de leche de animales enfermos y/o de los que están bajo tratamiento
- ❑ Registros de los animales tratados
- ❑ Controles de antibióticos en la propia explotación

GUÍAS DE PRÁCTICAS CORRECTAS DE HIGIENE

VACUNO DE LECHE



GOBIERNO
DE ESPAÑA

MINISTERIO
DE MEDIO AMBIENTE
Y MEDIO RURAL Y MARINO

GUÍA PARA LA PRODUCCIÓN RESPONSABLE



MANUAL DE PRODUCCIÓN DE LECHE CRUDA DE VACA



MINISTERIO
DE AGRICULTURA, PESCA
Y DESARROLLO RURAL

SECRETARÍA XERAL
DE AGRICULTURA,
PESCA E DESARROLLO
RURAL

inlac

Organización Interprofesional Lácteos

MANUAL DE PRODUCCIÓN DE LECHE CRUDA DE OVEJA

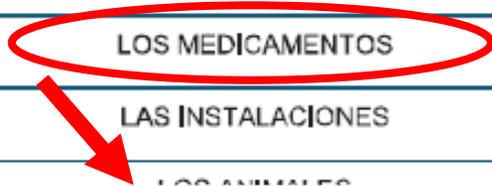


MANUAL DE PRODUCCIÓN DE LECHE CRUDA DE CABRA



ÁREAS DE LA EXPLOTACIÓN

1	DOCUMENTACIÓN EN GRANJA
2	LA LECHERÍA
3	LA SALA DE ORDEÑO
4	LAS MATERIAS PRIMAS
5	LOS MEDICAMENTOS
6	LAS INSTALACIONES
7	LOS ANIMALES



Seguridad Alimentaria

Protección del consumidor

Normativa Europea

Reglamento 2377/90/CEE

Reglamento 37/2010

Directiva 92/46/CEE

Directiva 96/23/CEE

Paquete Higiéne: Reglamentos 852/2004/CE;
853/2004/CEE; 854/2004/CE; 882/2004/CE

Decisión 2002/657/CE

LMR

Límite Máximo de Residuos

Control

Métodos detección inhibidores

Seguridad Alimentaria

LMR

Límite Máximo de Residuos

“Contenido de un determinado producto veterinario que se considera **admisible** en un producto alimenticio”

Reglamento UE 37/2010

Ejemplo:

Sustancia	LMR	Leche	Reglamento
<i>β-lactámicos</i>			
Penicilina	4	Todas especies	508/99
Amoxicilina	4	Todas especies	508/99
Ampicilina	4	Todas especies	508/99
Cefalexina	100	Vaca	2728/99
Cefalonio	20	Vaca	61/03
Cefoperazona	50	Vaca	807/01
Ceftiofur	100	Todas especies	1231/06

Para un principio activo (residuo marcador) y un tejido dado (tejido diana)

ANEXO

Cuadro 1: Lista de Sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere a los límites máximos de residuos (LMR): Sustancias autorizadas

Cuadro 2: Lista de sustancias prohibidas NO PUEDEN ESTABLECERSE LMRs

Protección del consumidor

Normativa Europea

Reglamento 2377/90/CEE

Directiva 92/46/CEE

Directiva 96/23/CEE

Paquete Higiene: Reglamentos 852/2004/CE;
853/2004/CEE; 854/2004/CE; 882/2004/CE

Decisión 2002/657/CE

LMR

Límite Máximo de Residuos

Control

Métodos detección inhibidores

Trazabilidad de la leche



Real Decreto 217/2004, de 6 de febrero, por el que se regulan la identificación y registro de los agentes, establecimientos y contenedores que intervienen en el sector lácteo, y el registro de los movimientos de la leche



Establece las bases del **sistema de trazabilidad para la leche** en España y crea un registro informatizado llamado **“base de datos Letra Q”**



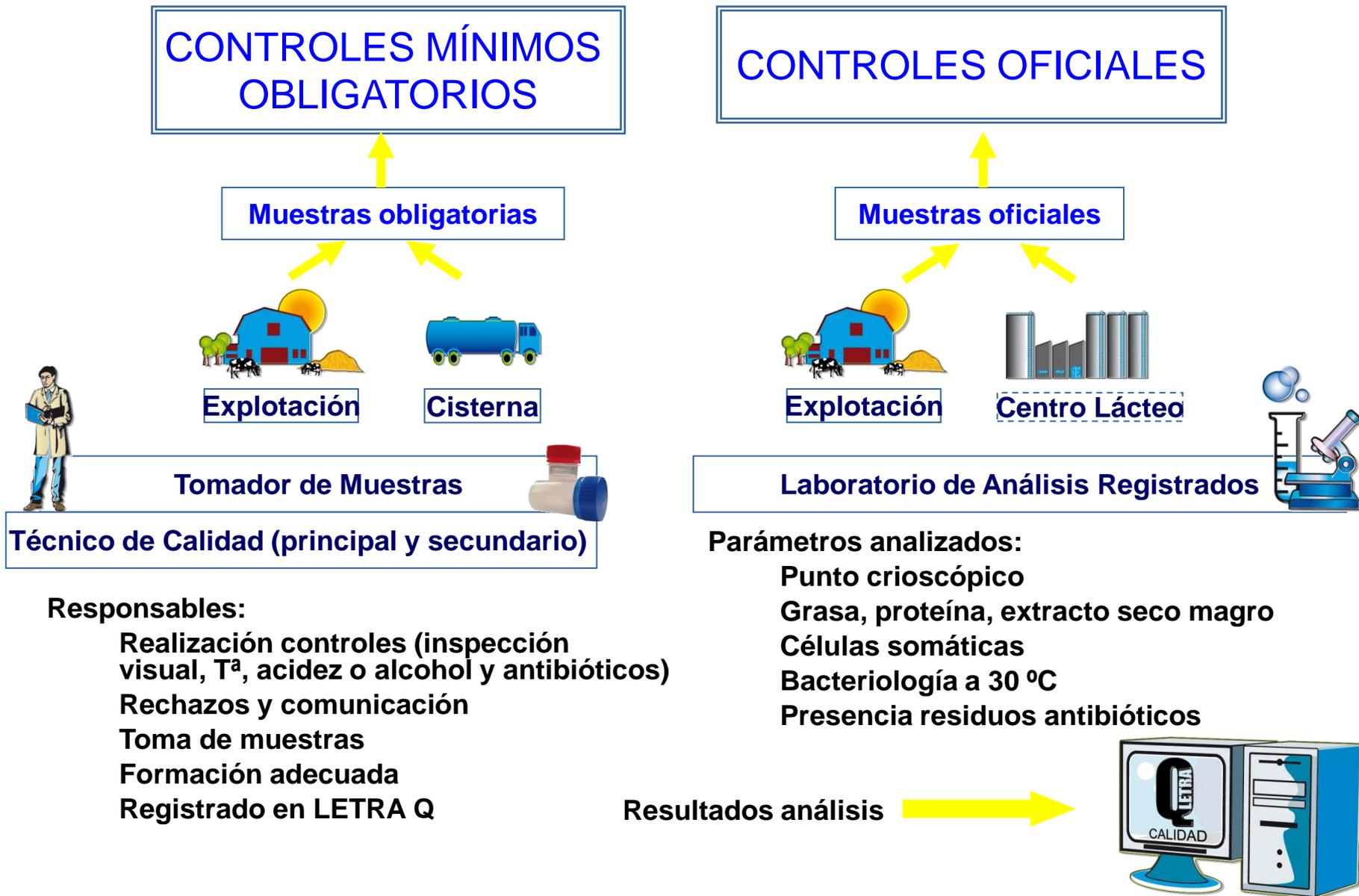
RD 1728/2007 de 21 de diciembre por el que se establece la normativa básica de control que deben cumplir los operadores del sector lácteo

Real Decreto 752/2011, de 27 de mayo, por el que se establece la normativa básica de control que deben cumplir los agentes del sector de leche cruda de oveja y cabra

Real Decreto 989/2022 de 29 de noviembre por el que se establecen normas básicas para el registro de los agentes del sector lácteo, movimientos de la leche y el control en el ámbito de la producción primaria y hasta la primera descarga

deroga y sustituye al Real Decreto 752/2011 y al Real Decreto 1728/2007 (hasta ahora vigentes) **a partir del 14 de marzo de 2023**

Sistema de Gestión de la Calidad y Trazabilidad de la Leche en España



Detección de Inhibidores



Residuos de antibióticos en leche

Clasificación de los métodos de detección

TIPOLOGÍA	ETAPA DEL CONTROL	CARACTERÍSTICAS	MÉTODOS MÁS EMPLEADOS
CRIBADO MÉTODOS CUALITATIVOS No específicos Requieren confirmación 	Laboratorio Interprofesional (controles LETRA Q y controles oficiales)	<i>Presencia o ausencia residuo:</i> Rápidos, baratos, fácil manejo	Microbiológicos (BRT, Blue Yellow Charm, Delvotest, Eclipse, ...)
	Explotación ganadera y Centro lácteo (controles LETRA Q y otros autocontroles)	<i>Específicos sustancia o grupo:</i> Muy rápidos, caros, fácil manejo	Enzimáticos Inmunoenzimáticos Unión a receptores (Beta Star, ROSA Charm, Penzym, Snap, Twinsensor,...)
CONFIRMACIÓN MÉTODOS CUANTITATIVOS	Organismos de control (muestreos aleatorios) PNIR	<i>Identificación y cuantificación:</i> Laboriosos, caros, calibración	Técnicas cromatográficas (HPLC, CG,...)

<https://www.youtube.com/watch?v=a5rD8rWGCxw>

Propiedades métodos de cribado cualitativos (Decisión 657/2002/CE)

Especificidad

Falsos no conformes (+)

- Composición de la leche (vaca vs oveja vs cabra)
- Inhibidores naturales (oveja > cabra > vaca)
- Células somáticas (cabra > oveja > vaca)
- Otros: otros medicamentos, detergentes, conservantes, ...

Capacidad Detección (CC β)

Falsos conformes (-)

- Diferente sensibilidad para distintos antimicrobianos

Propiedades estudiadas en la leche de vaca
Limitados estudios en leche de oveja y cabra

Métodos de cribado (screening)

❑ Métodos Lentos

- Microbiológicos

❑ Métodos rápidos

- Enzimático-colorimétricos

- Inmunoenzimáticos

- Métodos de receptores:

- ✓ Receptores microbianos
- ✓ Receptores proteicos (lateral flow assays)
- ✓ Biosensores

Métodos de cribado: Microbiológicos

- ❑ Basados en la inhibición del crecimiento microbiano
- ❑ Primeros métodos de detección de residuos antibióticos
- ❑ Procedimiento:
 - Se incubaba la muestra problema con un microorganismos indicador en un medio de cultivo (sólido o líquido)
 - ✓ Directamente sobre el medio
 - ✓ Pocillos realizados en el medio
 - ✓ Filtros de papel (discos) impregnados
 - Incubación durante varias horas (2,5 h a 24 h)
 - Si la muestra inhibe su crecimiento, la muestra es positiva
 - ✓ Inhibición se detecta por halos de inhibición
 - ✓ Inhibición se detecta por cambios en el color del medio (indicadores pH o redox)
 - Lectura visual o fotométrica
- ❑ Con algunos se puede pre-identificar grupo de sustancias
 - PABA, Penasa, SMMP

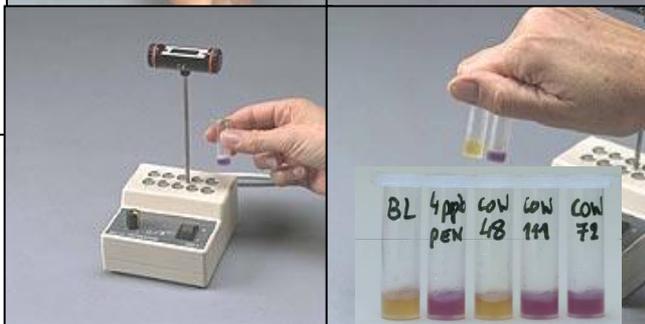
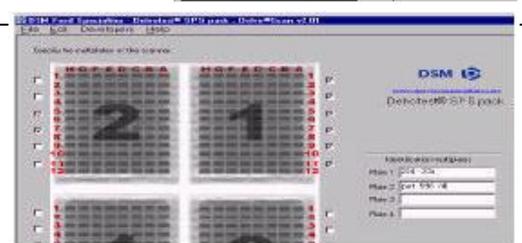
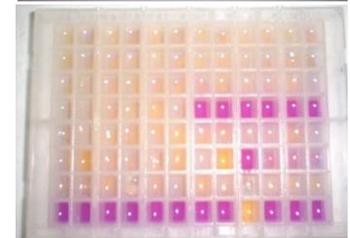
Métodos de cribado: **Microbiológicos**

Delvotest SP, Copan, Blue Yellow, Eclipse,... – **unas 3 h**

Incubación: 64 °C de G. stearothermophilus var. cadilolactis
Colorante indicador: Púrpura de bromocresol (acido).

BRT

Incubación: 64 °C de G. stearothermophilus var. cadilolactis
Colorante indicador: Negro brillante (redox).



100 µl leche



negative



detection
limit



positive

Métodos de cribado: **Microbiológicos**

Ventajas:

- ❑ Permiten detectar un espectro amplio de sustancias (varias familias)
- ❑ Sencillez, fácil uso, no se necesita equipamiento sofisticado (incubadores portátiles)
- ❑ Permiten analizar un gran número de muestras; Se pueden automatizar también las lecturas (fotométricas, escaner)
- ❑ Económicos ($\approx 0,20$ €)

Inconvenientes:

- ❑ Sensibilidad pobre frente a algunas familias de antibióticos
- ❑ Resultados en aprox. 3 h (NO MUY RÁPIDOS)
- ❑ No identifican la sustancia o familia de sustancias presentes, sólo revelan la presencia de una sustancia que inhibe el crecimiento del microorganismo indicador → Necesidad de confirmación para identificar el residuo y establecer si el residuo supera el LMR
- ❑ Si la lectura es visual → Posibilidad de error (subjetividad)

Métodos de cribado: Microbiológicos

Alta frecuencia de resultados falsos positivos en leche de oveja y cabra

Conservantes (azidiol, dicromato K,...)

Empeoran la especificidad
Prolongar t^o incubación (azidiol)
Dosificar correctamente (azidiol)

Molina et al., 2003b; Montero et al., 2005



Calostro

En primeras 48 h (↑ Ig e inhibidores naturales)
Evitar contaminaciones por calostro
Métodos actuales no aptos para calostro

Romero et al., 2014a

Presencia detergentes en la leche

Detergentes alcalinos (1 mL/L) y detergentes domésticos (sodio lauril sulfato/etanol)

Romero et al., 2014b; Romero et al., 2015

Uso de antiparasitarios

Algunos tests son sensibles a altas concentraciones in vitro

Albendazol o ivermectina en cabras

Romero et al., 2016, 2017

Romero T., 2015. Evaluation of false positive results in microbial inhibitor tests for screening antibiotics in goat milk. Tesis Doctoral. UPV

Matriz



Células somáticas: no interfiere

Beltrán et al., 2015a

Inhibidores naturales

calentar muestra

Molina et al., 2003b

↑↑ **grasa/proteína**

Beltrán et al., 2015a

métodos actuales, pocas interferencias



Métodos de cribado (screening)

❑ Métodos Lentos

- Microbiológicos

❑ Métodos rápidos

- Enzimático-colorimétricos

- Inmunoenzimáticos

- Métodos de receptores:

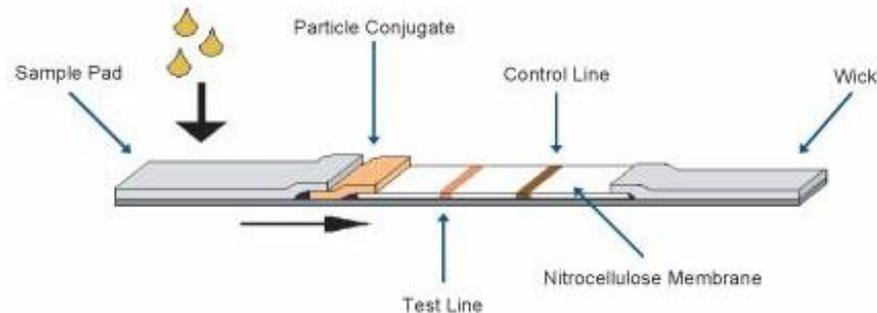
- ✓ Receptores microbianos

- ✓ Receptores proteicos (lateral flow assays)

- ✓ Biosensores

Métodos de cribado: **Receptores proteicos**

- ❑ Los más convenientes “in situ”
- ❑ Unión del antibiótico a receptores proteicos
- ❑ Competitivos
- ❑ Específicos de grupo o antibiótico
- ❑ Procedimiento:
 - Reactivo con un **receptor** proteico con actividad enzimática o conjugado con una enzima, y es **específico para el antibiótico**
 - **Dispositivo** de papel cromatográfico (membrana de nitrocelulosa) **tapizado con el antibiótico** y dos puntos de captura: control y muestra.



Métodos de cribado: Receptores proteicos

Rapid One Stay Assay – ROSA Charm

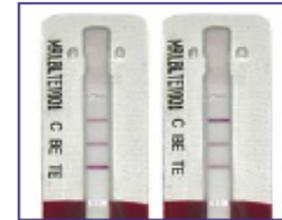


ROSA® : Sulfa & Tetracycline Tests for Raw Commingled Milk

ROSA : MRL Beta-lactam Test for Bovine Milk

ROSA® SMZ: Rapid Test for Sulfamethazine in Milk and Urine

ROSA : MRLBL/TET™ Test for Bovine Milk



BetaStar



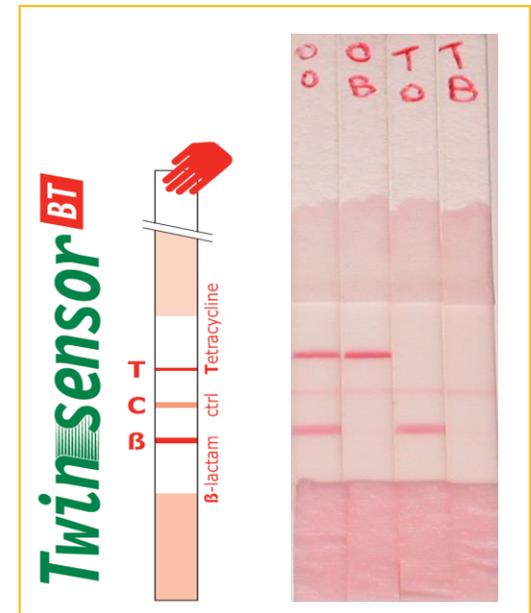
SNAP®



- BETA-LACTÁMICO
- TETRACICLINA
- AFLATOXINA M1
- GENTAMICINA
- SULFAMETAZINA



Twinsensor®



Métodos de cribado: **Receptores proteicos**

Ventajas:

- ❑ Resultados rápidos (≈ 10 min.)
- ❑ Específicos de antibiótico o familia (BL, TET, Enroflox,...)
- ❑ Sencillo, fácil de usar
- ❑ Lectura visual o con lector
- ❑ Incubadores y lectores portátiles adaptables a batería

Inconvenientes:

- ❑ Caro ($\approx 3 - 4$ €)
- ❑ Análisis de muestras individualizado
- ❑ No cuantifican; Sólo indican un positivo por encima del LD
 - Sensibilidad diversa (a veces $LD \ll LMR$ tetraciclinas)
- ❑ Positivos indican la presencia de un residuo, el paso sucesivo debería ser establecer si el residuo supera el LMR

¿Qué problemática presenta la
detección de inhibidores en la
leche?

Principales sustancias antimicrobianas



Los más usados en ganado lechero son...

VACUNO

- ❑ Antibióticos más usados en mamitis (por familias)
 - β -lactámicos > 60%
 - Aminoglucósidos > 25%
 - Resto: macrólidos>quinolonas>sulfamidas>tetraciclinas> otros
- ❑ Antibióticos más usados en mamitis (por moléculas)
 - Penicilina G y penetamato
 - Neomicina
 - Estreptomina
 - Gentamicina
 - Cloxacilina, ...



PEQUEÑOS RUMIANTES

- ❑ Antibióticos más usados en mamitis (por familias)
 - β -lactámicos > Macrólidos
- ❑ Antibióticos más usados (por moléculas)
 - Oxitetraciclina
 - Penicilina
 - Enrofloxacina
 - Amoxicilina
 - Tilosina
 - Eritromicina



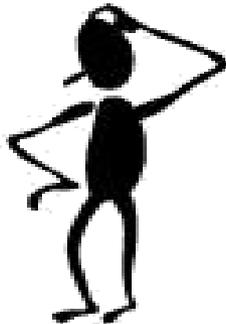
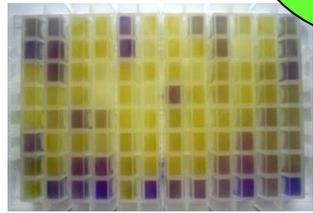
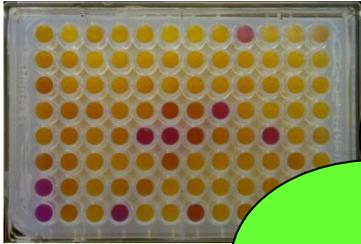
Escasez de medicamentos registrados y autorizados para pequeños rumiantes



Tendencia al uso de especialidades registradas para ganado vacuno (*extra-label*)

Métodos de cribado de antibióticos en la leche

¿Qué Método de detección usar ?



❑ Métodos microbiológicos de control en leche de cabra

Desarrollo inicial para vaca (elevado número de positivos en caprino)



Validación para cabra

Sierra et al., 2009a,b
Beltrán et al., 2015a



SENSIBILIDAD

ÓPTIMOS

Betalactámicos; Neomicina
Tilosina; Sulfadiacina; Sulfadimetoxina

LIMITADOS

Quinolonas, Tetraciclinas



ESPECIFICIDAD (Falsos Positivos)

$\text{Negativos/Total muestras} \times 100$
> 95%

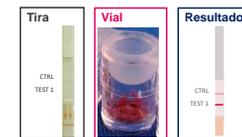
❑ Métodos de unión a receptores en leche de cabra

Desarrollo inicial para vaca

Charm MRL, BetaStar, SNAP, TwinsensorBT

Validación para oveja y cabra

Beltrán et al., 2013, 2014a,b, 2015a



Detectan <<<< al LMR, Alta especificidad, Sin reacciones cruzadas, No interfiere el azidiol

Métodos de control de residuos antibióticos en la leche de cabra

Capacidad limitada



Estrategia de análisis

Beltrán et al., 2015b
Berruga et al., 2016

Garantizar
Seguridad
consumidor

**Un único test permite
detectar entre 62-82% Ab**



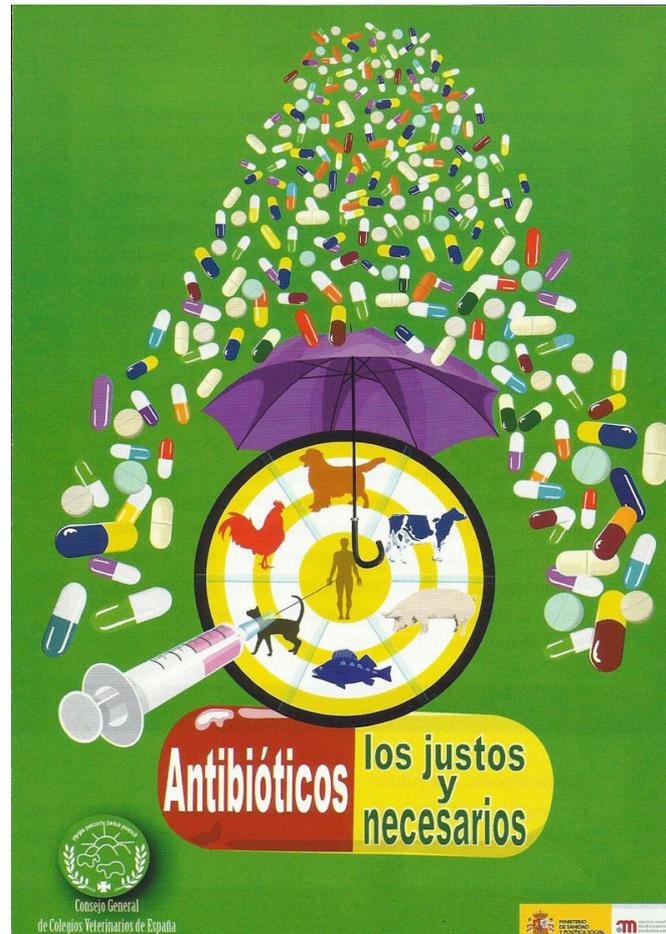
**Análisis simultáneo (microbiológicos y de receptores) aumenta
el alcance hasta el 90% de las sustancias empleadas**

¿ Macrólidos, Quinolonas, Aminoglucósidos?

**CONTROLES
PERIÓDICOS**

***Establecer una adecuada estrategia de
control de la presencia de residuos de
antibióticos en la leche***

Prevenamos juntos la resistencia a los antimicrobianos



Muchas gracias!!!