



Detección de inhibidores en leite cru de vaca: protocolo do Ligal

Neste artigo descríbense os controis mínimos obrigatorios en leite cru de vaca que a lexislación española esixe a produtores e industrias lácteas a fin de garantir a seguridade para o consumidor, e detállase o protocolo do Ligal para a detección de residuos de antibióticos en leite.

María Luisa Barreal López
Directora técnica do Ligal

INTRODUCCIÓN

O Real Decreto 1728/2007 establece os controis mínimos obrigatorios que deben realizar os produtores de leite cru de vaca e os demais axentes do sector vacún leiteiro en todas as súas etapas, así como as actuacións en caso de detectarse algún incumprimento nos controis realizados.

En relación á calidade do leite existen tres premisas fundamentais:

1. A calidade do leite debe controlarse en todas as etapas existentes entre o muxido e o consumo.
2. Se nos controis dalgunha das etapas existen sospeitas de incumprimento das normas de calidade, débese impedir o paso á seguinte etapa mentres non se investigue a sospeita.

3. Se despois da investigación anterior se confirma a sospeita, o leite debe retirarse do circuíto da alimentación humana.

RESPONSABLES DO CONTROL DO LEITE CRU DE VACA

Control desde o muxido ata a saída do leite da explotación:

- a) O responsable de calidade de leite e o gandeiro deberán tomar todas as medidas necesarias antes, durante e despois do muxido, co obxecto de garantir a calidade do leite producido.
- b) A autoridade competente da Consellería do Medio Rural (no caso da Comunidade Autónoma de Galicia) deberá supervisar o procedemento de muxido e o tratamento posterior, controlando a calidade do produto almacenado no tanque frío.



► O RESPONSABLE DE CALIDADE DE LEITE E O GANDEIRO DEBERÁN TOMAR TODAS AS MEDIDAS NECESARIAS ANTES, DURANTE E DESPOIS DO MUXIDO, CO OBXECTO DE GARANTIR A CALIDADE DO LEITE PRODUCIDO

durante a recollida e a súa traza-
bilidade ata a industria.

Control desde o tanque pulmón ata o consumidor:

- a) A responsabilidade destes controis correspóndelle ao responsable do centro lácteo.
- b) A autoridade competente da Consellería de Sanidade (no caso de Galicia) deberá controlar a calidade do produto desde a súa chegada ao centro lácteo ata o consumidor.

TOMA DE MOSTRAS NA EXPLOTACIÓN

1. A toma de mostras na explotación (denominadas mostras de auto-control ou de pago por calidade) será realizada polo tomador de mostras, que disporá da formación adecuada nesta materia.
2. Tomaranse en cada explotación as mostras necesarias para garantir un mínimo de dúas válidas ao mes para cada un dos seguintes parámetros: punto crioscópico, graxa, proteína, extracto seco magro, colonias de xermes a 30 °C e presenza de residuos de inhibidores; e para o parámetro de células

somáticas garantirase, como mínimo, unha mostra válida ao mes. Será o laboratorio de análise o que determine de maneira xustificada que mostras son válidas para cada proba.

3. As mostras serán tomadas do tanque de almacenamento do leite, verificando que a temperatura de conservación do tanque dúas horas despois do muxido non sexa inferior a 0 °C nin superior a 8 °C se a recollida é diaria, ou superior a 6 °C se a recollida non se efectúa diariamente. Ás mostras poderáselles engadir azidiol para a súa conservación e serán almacenadas e transportadas ata o laboratorio de análise a unha temperatura superior a 0 °C e, como máximo, a 8 °C (mostras con conservante).
4. En caso de explotacións con máis dun tanque, o tomador de mostras poderá tomar:
 - a. Unha única mostra formada por submostras proporcionais ao volume contido en cada tanque.
 - b. Unha mostra individual de cada tanque. ►►

Control desde a saída do tanque frío da explotación ata a entrada ao tanque pulmón do centro lácteo:

- a) O responsable ou responsables da recollida, o transporte e a calidade do centro lácteo deberán verificar a calidade do produto que teñen baixo a súa responsabilidade.
- b) A autoridade competente da Consellería do Medio Rural deberá controlar a calidade do produto

2 Soluciones PREMIUM para el control celular

POWER BLUE MIX



SELLADOR
MARCANTE
DE DIÓXIDO

POTENTE ACCIÓN
DESINFECTANTE

▼
Fungicidas
Bactericidas
Viricidas

FUERTE EFECTO
MARCANTE

▼
Aplicación
muy visible

HMVIR FILM +



SELLADOR CON
NUESTRA EXCLUSIVA
MOLECULA LSA®

REFORZADOS CON
AGENTES COSMÉTICOS

▼
Hidratación hasta
el siguiente
ordeño.

CONSUMO
CONTROLADO

▼
Viscosidad óptima
Sin goteo



EL NUEVO
NOMBRE
PARA

HYPRED Kilco® LCB food safety

antigerm medentech G3 Anvisy

KERSIA IBÉRICA, S.L. Tel: 948 32 45 32 | kersiaiberica@kersia-group.com www.kersia-group.com

En ambos os dous casos, sempre se tomará mostra de todos os tanques que conteñan leite na explotación no momento da recollida.

5. As mostras serán marcadas cunha etiqueta identificativa individual, na que figurarán os datos establecidos polo laboratorio de análise de acordo co operador. Incluirán, en calquera caso, todos os datos necesarios para permitir ao laboratorio identificar correctamente a mostra e enviar os resultados á «base de datos Letra Q». Sempre deberá indicarse a data de toma da mostra, con independencia do sistema utilizado para o seu rexistro.
6. As mostras identificadas individualmente analizaranse en laboratorios que estean rexistrados na base de datos Letra Q e que, ademais, estean acreditados de acordo coa versión en vigor da Norma ISO/IEC 17025 para todos os parámetros esixidos ás mostras de autocontrol.

TOMA DE MOSTRAS NO CENTRO LÁCTEO

1. A toma de mostras nas cisternas (mostras de autocontrol) será realizada polo técnico de calidade do centro lácteo, principal ou secundario, que deberá dispor de formación adecuada nesta materia.
2. Tomaranse dúas mostras de cada unha das cisternas á súa chegada ao centro lácteo antes da súa descarga.
3. No caso de que as cisternas dispoñan de varios compartimentos ou tanques independentes procederase, coma no caso da toma de mostras nas explotacións, con máis dun tanque.
4. A identificación farase de igual maneira que no caso das explotacións, dado que unha das mostras téñena que enviar ao laboratorio para analizar os mesmos parámetros que no caso das explotacións e a outra servirá para realizarlle in situ a proba de residuos de inhibidores.

PROBA DE DETECCIÓN DE ANTIBIÓTICOS

Condições que debe cumprir a proba de detección de antibióticos

1. *Proba de detección de residuos de antibióticos na mostra en explotación.* Ante a presenza ou sospeita de risco para o consumidor, realizaranse probas con carácter previo á carga do leite na cisterna que detecten, polo menos, residuos de antibióticos de betalactámicos e tetraciclinas no leite do tanque. O responsable da realización dos controis establecidos na explotación, así como da toma de mostras, será o tomador na devandita explotación, que deberá ter recibido unha formación adecuada, a cal se acreditará tras superar un curso sobre a materia que previamente fose validado pola autoridade competente.
2. *Proba de detección de residuos de antibióticos previa á descarga no centro lácteo.* Realizarase unha proba para a detección de residuos de antibióticos do grupo dos betalactámicos en todas as cisternas de transporte de leite cru e unha proba de detección de residuos de tetraciclinas nunha de cada cinco cisternas. Esta segunda proba realizarase de forma que todas as rutas sexan analizadas, ao menos, unha vez ao mes. O responsable da realización dos controis establecidos no centro lácteo, así como da toma de mostras, será o técnico de calidade do centro, principal ou secundario, que deberá ter recibido unha formación adecuada, a cal se acreditará tras superar un curso sobre a materia que previamente fose validado pola autoridade competente.
3. *Proba de detección de residuos de antibióticos no laboratorio de análise.* En todas as mostras recibidas se utilizarán métodos que detecten, como mínimo, residuos de betalactámicos e de tetraciclinas. Cando se utilice un método sensible a ambos os grupos de substancias e o resultado fose non conforme, o laboratorio procederá á identificación do

▶ EN TODAS AS MOSTRAS RECIBIDAS NO LABORATORIO SE UTILIZARÁN MÉTODOS QUE DETECTEN, COMO MÍNIMO, RESIDUOS DE BETALACTÁMICOS E DE TETRACICLINAS

grupo. O laboratorio de análise deberá estar acreditado para todas as determinacións esixidas ás mostras de autocontrol (tanto ás procedentes das explotacións como ás das cisternas).

4. *Os métodos utilizados para a realización desta proba deberán cumprir os seguintes requisitos:*
 - a. Estar validados polo fabricante. A validación realizárase con arranxo a normas ou protocolos recoñecidos internacionalmente.
 - b. Deberán ser capaces de detectar, polo menos, amoxicilina e ampicilina, entre os betalactámicos, e oxitetraciclina, entre as tetraciclinas. Estes poderán ser específicos de cada grupo e, opcionalmente, poderanse utilizar probas capaces de detectar simultaneamente ambos os grupos, sempre que se cumpra a frecuencia do grupo dos betalactámicos.
 - c. Deberán ser capaces de detectar os límites máximos de residuos dos antibióticos establecidos no Regulamento (CE) n° 37/2010 da Comisión, de 22 de decembro de 2009, relativo ás substancias farmacologicamente activas e a súa clasificación, polo que se refire aos límites máximos de residuos nos produtos alimenticios de orixe animal. ▶

GALICAL

CALES E CARBONATOS AGRÍCOLAS



Mestura de carbonato e serradura para as camas



A mestura de carbonato cálcico con serradura proporciona unha cama cómoda e hixiénica para o gando.

O emprego de carbonato facilita un bo descanso da vaca, axuda a reducir as posibles infeccións que provocan mami-tes causadas por bacterias de tipo ambiental, tales como *E. coli*, estreptococos, enterobacterias etc., e diminúe ou elimina os problemas de dermatite (dixital e interdixital), úlceras e uñeiros nos pezuños dos animais, evitando así coxeiras e perdas na produción de leite.

Ademais, o carbonato cálcico tamén enriquece de calcio o xurro, que, utilizado como fertilizante orgánico nas terras de cultivo, achegará un nivel aceptable de calcio.



GALICAL SL
CALES E DOLOMÍAS AGRÍCOLAS



R/ Gallastegui Unamuno.
Vial G - N.º 7
Polígono Industrial As Gándaras
27003 Lugo

Fax 982 22.14.08
E-mail: info@galical.es
Web: www.galical.es

INHIBIDORES

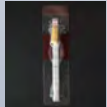
TEST RÁPIDO-ROSA CHARM

β -lactámicos/Tetraciclínas/Quinolonas/Cloranfenicol

Unión do **antibiótico** a un receptor proteico conxugado a unha enzima específico para cada antibiótico



SEMENTEIRA
300µl







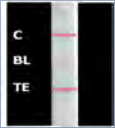
INCUBACIÓN
56±1°C 8 minutos

LECTURA DE RESULTADOS: FOTÓMETRO

Lectura visual (non aconsellable)

Negativo: a marca da mostra é máis escura ou igual que a marca control.

Positivo: a marca da mostra é máis clara que a marca control.

▶ OS MÉTODOS LENTOS DANNOS MÁIS INFORMACIÓN SOBRE A PRESENZA DOUTROS ANTIBIÓTICOS DISTINTOS A BETALACTÁMICOS E TETRACICLINAS (OU QUINOLONAS NO CASO DO LIGAL)

Métodos para a detección de residuos de antibióticos en leite cru de vaca

Métodos rápidos

Son métodos cualitativos e son selectivos para un grupo reducido de antibióticos, xeralmente betalactámicos e tetraciclínas. No Ligal estase utilizando o método ROSA CHARM tanto para betalactámicos e tetraciclínas como para quinolonas, todos eles nun curto período de tempo.

Estes métodos poderán ser utilizados:

- Polo tomador de mostras antes da descarga do leite do tanque ao camiión, no caso de presenza ou sospeita de antibióticos.
- Polo técnico de calidade do centro lácteo antes da descarga da cisterna no centro.
- Polo laboratorio de análise para a identificación do grupo de antibióticos (polo menos betalactámicos/tetraciclínas) no caso dunha mostra que previamente dese positiva ao test lento de inhibidores.
- Polo persoal de inspección do Ligal (na Comunidade Autónoma de Galicia) para o control de inhibidores do leite no tanque, como consecuencia dun resultado positivo ao test lento de inhibidores na mostra previa de autocontrol.

Métodos lentos

Son métodos microbiolóxicos con períodos de incubación longos. Tamén son métodos cualitativos, pero son selectivos a un maior número de antibióticos que os test rápidos e, por tanto, ademais de detectar os betalactámicos e as tetraciclínas (ou quinolonas no caso do Ligal), dannos

máis información sobre a presenza doutros antibióticos distintos a estes, polo que se utilizan para determinar a presenza de inhibidores nas mostras de autocontrol. O tempo da realización deste test está entre dúas e tres horas. O método lento usado no Ligal é o Delvotest.

En todos os test lentos é moi importante controlar ben a temperatura e o tempo de incubación e non se deben realizar nunca a tempo fixo, sobre todo se se trata de mostras de tanques da explotación ou de cisternas. Para iso é importante dispor de testemuños negativos e positivos a inhibidores, que nos van permitir controlar este tempo de incubación en cada caso.

Estes métodos deberán ser utilizados por:

- Os centros lácteos como método complementario ao test rápido

cando este dea un resultado positivo na mostra da cisterna e/ou explotación.

- Os laboratorios de análise para todas as mostras de autocontrol, tanto das explotacións como das cisternas. A todas as mostras positivas a este test deberáselles facer o test rápido para identificar o grupo de antibiótico (polo menos os betalactámicos/tetraciclínas).

Método de cromatografía líquida (HPLC-MS/MS)

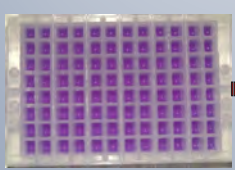
Permite a identificación e cuantificación dos antibióticos. No Ligal este método faise a petición dos produtores ou operadores lácteos, se o desexan, así como a todas as mostras procedentes do Control Oficial que deron positivas no test lento. No caso das mostras oficiais, se a concentración

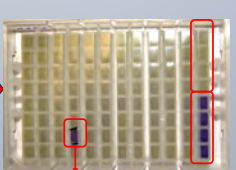
LECTURA DE RESULTADOS: equipo ESCÁNER (nunca visualmente)



LECTOR
ESCÁNER







Testemuños negativos

Testemuños positivos

Mostra positiva

de antibiótico é superior ao límite máximo de residuo (LMR) permitido para ese antibiótico, as autoridades competentes poden proceder a un expediente sancionador tanto ao produtor como ao centro lácteo, segundo a procedencia da mostra.

PROTOCOLO DE INHIBIDORES EN MOSTRAS DE AUTOCONTROL DE LEITE CRU DE VACA: METODOLOXÍA DE TRABALLO NO LIGAL

A todas as mostras de pago por calidade ás que se lles faga a proba de inhibidores, o primeiro ensaio que se realiza é o test lento Delvotest, cuxo resultado pode ser negativo ou positivo.

1. No caso dun resultado negativo ao test lento, infórmase como negativo a inhibidores.
2. No caso dun resultado positivo ao test lento, realízase o test rápido Rosa Charm (MRLBL/TET/QUIN) para a identificación de grupos betalactámicos, tetraciclina e quinolonas:
 - a. Se o resultado ao test rápido é positivo, infórmase como positivo a betalactámicos e/ou tetraciclina e/ou quinolonas.
 - b. Se o resultado do test rápido é negativo, fanse varias repeticións do test lento Delvotest:
 - i. Se estas dan resultado negativo, infórmase como negativo.
 - ii. Se estas dan resultado positivo, infórmase como positivo a outros grupos de antibióticos diferentes a betalactámicos e/ou tetraciclina e/ou quinolonas.

Test específico de quinolonas (enrofloxacinas)

Este ensaio, á parte de facerse a todas as mostras positivas ao test lento, tamén se realiza aleatoriamente a un 10-12 % das explotacións lácteas que deron resultado negativo ao Delvotest.

1. Se o resultado deste test de quinolonas é negativo, infórmase como negativo a inhibidores.
2. Se o resultado a este test de quinolonas é positivo, confírmase coa técnica HPLC-MS/MS co fin de identificar e cuantificar o antibiótico:
 - a. Se o resultado de HPLC-MS/MS é inferior ao límite de cuantificación da técnica, considérase negativo.



▶ A TODAS AS MOSTRAS DE PAGO POR CALIDADE ÁS QUE SE LLES FAGA A PROBA DE INHIBIDORES, O PRIMEIRO ENSAIO QUE SE REALIZA É O TEST LENTO DELVOTEST

- b. Se o resultado de HPLC-MS/MS é superior ao límite de cuantificación, pero inferior ao LMR establecido para o antibiótico identificado, considérase negativo, pero infórmase á Consellería do Medio Rural e ten efectos no Recaldi (Registro de Explotacións de Calidade de Leite Diferenciada).
- c. Se o resultado de HPLC-MS/MS é maior que o LMR establecido para o antibiótico identificado, infórmase como positivo a quinolonas.
3. Á Consellería do Medio Rural envíaselle diariamente por correo electrónico a relación de todos os positivos.
4. Á Consellería de Sanidade envíaselle mensualmente por correo electrónico a relación de todos os positivos.

Actuación da inspección do Ligal

Unha vez comunicado ese resultado positivo ás distintas partes, un inspector do Ligal desprázase á explotación (xeralmente ao día seguinte á toma da mostra se o produtor dispón de leite no tanque) e procede á realización do test rápido, se se trata de antibióticos betalactámicos/tetraciclina, ou á toma de mostra para analizar no Ligal, se se trata doutros inhibidores diferentes aos anteriores.

Comunicación de incumprimento (positivo á determinación de inhibidores)

Todos os resultados positivos ao test lento de inhibidores, así como a identificación do grupo correspondente, son comunicados polo Ligal canto antes:

1. Ao operador lácteo por SMS no mesmo momento de detectarse cada un dos positivos (xeralmente ao día seguinte á toma da mostra). Tamén se lle envía un correo electrónico coa relación de positivos diarios, unha vez finalizada a análise de todos os inhibidores.
2. Ao produtor por SMS no mesmo momento de detectarse o positivo (xeralmente ao día seguinte á toma da mostra), sempre que previamente lle comunicase o seu número de teléfono móbil ao Ligal.

- a) Se o resultado do test rápido realizado polo inspector na explotación é positivo a betalactámicos/tetraciclina, procédese á inmovilización do leite da explotación, incluído o existente no tanque se o gandeiro non decide destruílo voluntariamente.
- b) No caso de presenza de quinolonas, o inspector realizará unha toma de mostra para confirmar no Ligal mediante a técnica HPLC-MS/MS co fin de identificar e cuantificar o antibiótico. Se o resultado de HPLC-MS/MS é inferior ao límite de cuantificación da técnica, considérase ▶▶

como negativo; se o resultado da HPLC-MS/MS é superior ao límite de cuantificación, pero inferior ao LMR establecido para o antibiótico identificado, considérase como negativo, pero infórmase á Consellería do Medio Rural. Se o resultado de HPLC-MS/MS é superior ao LMR establecido para o antibiótico identificado, considérase positivo a quinolonas.

c) No caso de presenza doutros grupos de antibióticos diferentes a betalactámicos, tetraciclina ou quinolonas, o inspector realizará unha toma de mostra a este novo leite, que será analizado no Ligal mediante o test lento Delvotest.

Se o resultado da mostra de inspección é negativo, tanto in situ coma no Ligal, autorízase a entrega de leite, pero mantense o incumprimento correspondente ao resultado positivo obtido no test lento da mostra anterior.

Se o resultado da mostra de inspección é positivo, tanto in situ coma no Ligal, a Consellería do Medio Rural faise cargo do control posterior, procedendo á toma de mostra oficial e entrando en marcha un procedemento administrativo coa posible sanción posterior, no caso de volver dar positivo.

Tempo medio de actuación ante un resultado con presenza de inhibidores

Os ensaios no Ligal fanse xeralmente ao día seguinte da toma da mostra que realiza o operador lácteo na explotación, ao igual que a visita de inspección á explotación gandeira (a condición de que exista leite no tanque); a actuación da Consellería do Medio Rural adoita producirse dous días despois da toma de mostra realizada polo operador lácteo. ■

NOTA DA AUTORA

Elaboración propia con base no Real Decreto 1728/2007 e no Protocolo de inhibidores (Consellería do Medio Rural-Ligal)

Esquemas do protocolo de inhibidores do Ligal

