



Detección de inhibidores en leche cruda de vaca: protocolo del Ligal

En este artículo se describen los controles mínimos obligatorios en leche cruda de vaca que la legislación española exige a productores e industrias lácteas, a fin de garantizar la seguridad para el consumidor, y se detalla el protocolo del Ligal para la detección de residuos de antibióticos en leche.

María Luisa Barreal López
Directora técnica del Ligal

INTRODUCCIÓN

El Real Decreto 1728/2007 establece los controles mínimos obligatorios que deben realizar los productores de leche cruda de vaca y los demás agentes del sector vacuno lechero en todas sus etapas, así como las actuaciones en caso de detectarse algún incumplimiento en los controles realizados.

En relación a la calidad de la leche existen tres premisas fundamentales:

1. La calidad de la leche debe controlarse en todas las etapas existentes entre el ordeño y el consumo.
2. Si en los controles de alguna de las etapas existen sospechas de incumplimiento de las normas de calidad, se debe impedir el paso a la siguiente etapa mientras no se investigue la sospecha.

3. Si después de la investigación anterior se confirma la sospecha, la leche debe retirarse del circuito de la alimentación humana.

RESPONSABLES DEL CONTROL DE LA LECHE CRUDA DE VACA

Control desde el ordeño hasta la salida de la leche de la explotación:

- a) El responsable de calidad de leche y el ganadero deberán tomar todas las medidas necesarias antes, durante y después del ordeño, con el objeto de garantizar la calidad de la leche producida.
- b) La autoridad competente de la Consellería del Medio Rural (en el caso de la Comunidad Autónoma de Galicia) deberá supervisar el procedimiento de ordeño y el tratamiento posterior, controlando la calidad del producto almacenado en el tanque frío.



► EL RESPONSABLE DE CALIDAD DE LECHE Y EL GANADERO DEBERÁN TOMAR TODAS LAS MEDIDAS NECESARIAS ANTES, DURANTE Y DESPUÉS DEL ORDEÑO, CON EL OBJETO DE GARANTIZAR LA CALIDAD DE LA LECHE PRODUCIDA

Control desde la salida del tanque frío de la explotación hasta la entrada al tanque pulmón del centro lácteo:

- a) El responsable o responsables de la recogida, el transporte y la calidad del centro lácteo deberán verificar la calidad del producto que tienen bajo su responsabilidad.
- b) La autoridad competente de la Consellería del Medio Rural deberá controlar la calidad del producto durante la recogida y su trazabilidad hasta la industria.

Control desde el tanque pulmón hasta el consumidor:

- a) La responsabilidad de estos controles le corresponde al responsable del centro lácteo.
- b) La autoridad competente de la Consellería de Sanidad (en el caso de Galicia) deberá controlar la calidad del producto desde su llegada al centro lácteo hasta el consumidor.

TOMA DE MUESTRAS EN LA EXPLOTACIÓN

1. La toma de muestras en la explotación (denominadas muestras de autocontrol o de pago por calidad) será realizada por el tomador de muestras, que dispondrá de la formación adecuada en esta materia.
2. Se tomarán en cada explotación las muestras necesarias para garantizar un mínimo de dos muestras válidas al mes para cada uno de los siguientes parámetros: punto crioscópico, grasa, proteína, extracto seco magro, colonias de gérmenes a 30 °C y presencia de residuos de inhibidores; y para el parámetro de células somáticas se garanti-

zará al menos una muestra válida al mes. Será el laboratorio de análisis el que determine de manera justificada qué muestras son válidas para cada prueba.

3. Las muestras serán tomadas del tanque de almacenamiento de la leche, verificando que la temperatura de conservación del tanque dos horas después del ordeño no sea inferior a 0 °C ni superior a 8 °C, si la recogida es diaria, o superior a 6 °C, si la recogida no se efectúa diariamente. A las muestras se les podrá añadir azidiol para su conservación y serán almacenadas y transportadas hasta el laboratorio de análisis a una temperatura superior a 0 °C y, como máximo, a 8 °C (muestras con conservante).
4. En caso de explotaciones con más de un tanque, el tomador de muestras podrá tomar:
 - a. Una única muestra formada por submuestras proporcionales al volumen contenido en cada tanque.
 - b. Una muestra individual de cada tanque. ►►

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 Lhoisy

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

En ambos casos, siempre se tomará muestra de todos los tanques que contengan leche en la explotación en el momento de la recogida.

5. Las muestras serán marcadas con una etiqueta identificativa individual, en la que figurarán los datos establecidos por el laboratorio de análisis de acuerdo con el operador. Incluirán, en cualquier caso, todos los datos necesarios para permitir al laboratorio identificar correctamente la muestra y enviar los resultados a la «base de datos Letra Q». Siempre deberá indicarse la fecha de toma de la muestra, con independencia del sistema utilizado para su registro.
6. Las muestras identificadas individualmente se analizarán en laboratorios que estén registrados en la base de Letra Q y que, además, estén acreditados de acuerdo con la versión en vigor de la Norma ISO/IEC 17025 para todos los parámetros exigidos a las muestras de autocontrol.

TOMA DE MUESTRAS EN EL CENTRO LÁCTEO

1. La toma de muestras en las cisternas (muestras de autocontrol) será realizada por el técnico de calidad del centro lácteo, principal o secundario, que deberá disponer de formación adecuada en esta materia.
2. Se tomarán dos muestras de cada una de las cisternas a su llegada al centro lácteo antes de su descarga.
3. En caso de que las cisternas dispongan de varios compartimentos o tanques independientes se procederá, como en el caso de la toma de muestras en las explotaciones, con más de un tanque.
4. La identificación se hará de igual manera que en el caso de las explotaciones, dado que una de las muestras la tienen que enviar al laboratorio de análisis para realizar los mismos parámetros que en el caso de las explotaciones y la otra servirá para realizarle *in situ* la prueba de residuos de inhibidores.

PRUEBA DE DETECCIÓN DE ANTIBIÓTICOS

Condiciones que debe cumplir la prueba de detección de antibióticos

1. *Prueba de detección de residuos de antibióticos en la muestra en explotación.* Ante la presencia o sospecha de riesgo para el consumidor, se realizarán pruebas con carácter previo a la carga de la leche en la cisterna que detecten, al menos, residuos de antibióticos de betalactámicos y tetraciclinas en la leche del tanque. El responsable de la realización de los controles establecidos en la explotación, así como de la toma de muestras, será el tomador de muestras en dicha explotación, que deberá haber recibido una formación adecuada, la cual se acreditará tras haber superado un curso sobre la materia que previamente haya sido validado por la autoridad competente.
2. *Prueba de detección de residuos de antibióticos previa a la descarga en el centro lácteo.* Se realizará una prueba para la detección de residuos de antibióticos del grupo de los betalactámicos en todas las cisternas de transporte de leche cruda y una prueba de detección de residuos de tetraciclinas en una de cada cinco cisternas. Esta segunda prueba se realizará de forma que todas las rutas sean analizadas, al menos, una vez al mes. El responsable de la realización de los controles establecidos en el centro lácteo, así como de la toma de muestras, será el técnico de calidad del centro lácteo, principal o secundario, que deberá haber recibido una formación adecuada, la cual se acreditará tras haber superado un curso sobre la materia que previamente haya sido validado por la autoridad competente.
3. *Prueba de detección de residuos de antibióticos en el laboratorio de análisis.* En todas las muestras recibidas se utilizarán métodos que detecten, al menos, residuos de betalactámicos y de tetraciclinas. Cuando se utilice un método sensible a ambos grupos de sustancias y el resul-

▶ EN TODAS LAS MUESTRAS RECIBIDAS EN EL LABORATORIO SE UTILIZARÁN MÉTODOS QUE DETECTEN, AL MENOS, RESIDUOS DE BETALACTÁMICOS Y DE TETRACICLINAS

tado fuera no conforme, el laboratorio procederá a la identificación del grupo. El laboratorio de análisis deberá estar acreditado para todas las determinaciones exigidas a las muestras de autocontrol (tanto a las muestras procedentes de las explotaciones como a las de las cisternas).

4. *Los métodos utilizados para la realización de esta prueba deberán cumplir los siguientes requisitos:*
 - a. Estar validados por el fabricante. La validación se realizará con arreglo a normas o protocolos reconocidos internacionalmente.
 - b. Deberán ser capaces de detectar, al menos, amoxicilina y ampicilina, entre los betalactámicos, y oxitetraclina, entre las tetraciclinas. Estos podrán ser específicos de cada grupo y, opcionalmente, se podrán utilizar pruebas capaces de detectar simultáneamente ambos grupos, siempre y cuando se cumpla la frecuencia del grupo de los betalactámicos.
 - c. Deberán ser capaces de detectar los límites máximos de residuos de los antibióticos establecidos en el Reglamento (CE) n° 37/2010 de la Comisión, de 22 de diciembre de 2009, relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación, por lo que se refiere a los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal. ▶

GALICAL

CALES Y CARBONATOS AGRÍCOLAS



Mezcla de carbonato y serrín para las camas

La mezcla de carbonato cálcico con serrín proporciona una cama cómoda e higiénica para el ganado.

El empleo de carbonato facilita un buen descanso de la vaca, ayuda a reducir las posibles infecciones que provocan mamitis causadas por bacterias de tipo ambiental, tales como *E. coli*, estreptococos, enterobacterias, etc., y disminuye o elimina los problemas de dermatitis (digital e interdigital), úlceras y panadizos en las pezuñas de los animales, evitando así cojeras y pérdidas en la producción de leche.

Además, el carbonato cálcico también enriquece de calcio el purín, que, utilizado como abono orgánico en las tierras de cultivo, aportará un nivel aceptable de calcio.



GALICAL SL
CALES Y 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

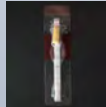
TEST RÁPIDO-ROSA CHARM

β -lactámicos/Tetraciclinas/Quinolonas/Cloranfenicol

Unión del **antibiótico** a un receptor proteico conjugado a una **enzima** específico para cada antibiótico.



SIEMBRA
300µl







INCUBACIÓN
56±1°C 8 minutos



LECTURA DE RESULTADOS: FOTÓMETRO

Lectura visual (no aconsejable)

Negativo: la marca de la muestra es más oscura o igual que la marca control

Positivo: la marca de la muestra es más clara que la marca control.



C
BL
TE

► LOS MÉTODOS LENTOS NOS DAN MÁS INFORMACIÓN SOBRE LA PRESENCIA DE OTROS ANTIBIÓTICOS DISTINTOS A BETALACTÁMICOS Y TETRACICLINAS (O QUINOLONAS EN EL CASO DEL LIGAL)

Métodos para la detección de residuos de antibióticos en leche cruda de vaca

Métodos rápidos

Son métodos cualitativos y son selectivos para un grupo reducido de antibióticos, generalmente betalactámicos y tetraciclinas. En el Ligal se está utilizando el método ROSA CHARM tanto para betalactámicos y tetraciclinas como para quinolonas, todos ellos en un corto periodo de tiempo.

Estos métodos podrán ser utilizados:

- Por el tomador de muestra antes de la descarga de la leche del tanque al camión, en el caso de presencia o sospecha de antibióticos.
- Por el técnico de calidad del centro lácteo antes de la descarga de la cisterna en el centro.
- Por el laboratorio de análisis para la identificación del grupo de antibióticos (al menos betalactámicos/tetraciclinas), en el caso de una muestra que previamente haya dado positiva al test lento de inhibidores.
- Por el personal de inspección del Ligal (en la Comunidad Autónoma de Galicia) para el control de inhibidores de la leche en el tanque, como consecuencia de un resultado positivo al test lento de inhibidores en la muestra previa de autocontrol.

Métodos lentos

Son métodos microbiológicos con periodos de incubación largos. También son métodos cualitativos, pero son selectivos a un mayor número de antibióticos que los test rápidos y,

por lo tanto, además de detectar los betalactámicos y las tetraciclinas (o quinolonas en el caso del Ligal), nos dan más información sobre la presencia de otros antibióticos distintos a estos, por lo que se utilizan para determinar la presencia de inhibidores en las muestras de autocontrol. El tiempo de la realización de estos test está entre dos y tres horas. El método lento usado en el Ligal es el Delvotest.

En todos los test lentos es muy importante controlar bien la temperatura y el tiempo de incubación y no se deben realizar nunca a tiempo fijo, sobre todo si se trata de muestras de tanques de la explotación o de cisternas. Para ello es importante disponer de testigos negativos y positivos a inhibidores, que nos van a permitir controlar este tiempo de incubación en cada caso.

Estos métodos deberán ser utilizados por:

- Los centros lácteos como método complementario al test rápido cuando este dé un resultado positivo en la muestra de la cisterna y/o explotación.
- Los laboratorios de análisis para todas las muestras de autocontrol, tanto de las explotaciones como de las cisternas. A todas las muestras positivas a este test se les deberá hacer el test rápido para identificar el grupo de antibiótico (al menos los betalactámicos/tetraciclinas).

Método de cromatografía líquida (HPLC-MS/MS)

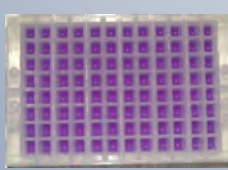
Permite la identificación y cuantificación de los antibióticos. En el Ligal este método se hace a petición de los productores u operadores lácteos,

LECTURA DE RESULTADOS: equipo ESCÁNER (nunca visualmente)

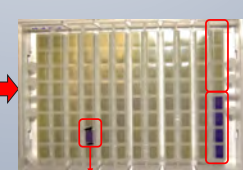


LECTOR
ESCÁNER





Muestra positiva



Testigos negativos
Testigos positivos

si lo desean, así como a todas las muestras procedentes del Control Oficial que han dado positivas en el test lento. En el caso de las muestras oficiales, si la concentración de antibiótico es superior al límite máximo de residuo (LMR) permitido para ese antibiótico, las autoridades competentes pueden proceder a un expediente sancionador tanto al productor como al centro lácteo, según la procedencia de la muestra.

PROTOCOLO DE INHIBIDORES EN MUESTRAS DE AUTOCONTROL DE LECHE CRUDA DE VACA: METODOLOGÍA DE TRABAJO EN EL LIGAL

A todas las muestras de pago por calidad a las que se les haga la prueba de inhibidores, el primer ensayo que se realiza es el test lento Delvotest, cuyo resultado puede ser negativo o positivo.

1. En el caso de un resultado negativo al test lento, se informa como negativo a inhibidores.
2. En el caso de un resultado positivo al test lento, se realiza el test rápido Rosa Charm (MRLBL/TET/QUIN) para la identificación de grupos betalactámicos, tetraciclinas y quinolonas:
 - a. Si el resultado al test rápido es positivo, se informa como positivo a betalactámicos y/o tetraciclinas y/o quinolonas.
 - b. Si el resultado del test rápido es negativo, se hacen varias repeticiones del test lento Delvotest:
 - i. Si estas dan resultado negativo, se informa como negativo.
 - ii. Si estas dan resultado positivo, se informa como positivo a otros grupos de antibióticos diferentes a betalactámicos y/o tetraciclinas y/o quinolonas.

Test específico de quinolonas (enrofloxacinas)

Este ensayo, aparte de hacerse a todas las muestras positivas al test lento, también se realiza aleatoriamente a un 10-12 % de las explotaciones lácteas que han dado resultado negativo al Delvotest.

1. Si el resultado de este test de quinolonas es negativo, se informa como negativo a inhibidores.
2. Si el resultado a este test de quinolonas es positivo, se confirma con la técnica HPLC-MS/MS, con



► A TODAS LAS MUESTRAS DE PAGO POR CALIDAD A LAS QUE SE LES HAGA LA PRUEBA DE INHIBIDORES, EL PRIMER ENSAYO QUE SE REALIZA ES EL TEST LENTO DELVOTEST

el fin de identificar y cuantificar el antibiótico:

- a. Si el resultado de HPLC-MS/MS es inferior al límite de cuantificación de la técnica, se considera negativo.
- b. Si el resultado de HPLC-MS/MS es superior límite de cuantificación, pero inferior al LMR establecido para el antibiótico identificado, se considera negativo, pero se informa a la Conselleria del Medio Rural, teniendo efectos en el Recaldi (Registro de Explotaciones de Calidad de Leche Diferenciada).
- c. Si el resultado de HPLC-MS/MS es mayor que el LMR establecido para el antibiótico identificado, se informa como positivo a quinolonas.

Comunicación de incumplimiento (positivo a la determinación de inhibidores)

Todos los resultados positivos al test lento de inhibidores, así como la identificación del grupo correspondiente, son comunicados por el Ligal lo antes posible:

1. Al operador lácteo por SMS en el mismo momento de detectarse cada uno de los positivos (generalmente al día siguiente a la toma de la muestra). También se le envía un correo electrónico con la relación de positivos diarios, una vez finalizado el análisis de todos los inhibidores.

2. Al productor por SMS en el mismo momento de detectarse el positivo (generalmente al día siguiente a la toma de la muestra), siempre que previamente haya comunicado su número de teléfono móvil al Ligal.
3. A la Conselleria del Medio Rural se envía diariamente por correo electrónico la relación de todos los positivos.
4. A la Conselleria de Sanidade se envía mensualmente por correo electrónico la relación de todos los positivos.

Actuación de la inspección del Ligal

Una vez comunicado ese resultado positivo a las distintas partes, un inspector del Ligal se desplaza a la explotación (generalmente al día siguiente a la toma de la muestra si el productor dispone de leche en el tanque) y procede a la realización del test rápido, si se trata de antibióticos betalactámicos/tetraciclinas, o a la toma de muestra para analizar en el Ligal, si se trata de otros inhibidores diferentes a los anteriores.

- a) Si el resultado del test rápido realizado por el inspector en la explotación es positivo a betalactámicos/tetraciclinas, se procede a la inmovilización de la leche de la explotación, incluida la existente en el tanque si el ganadero no decide destruirla voluntariamente.
- b) En el caso de presencia de quinolonas, el inspector realizará una ►►

toma de muestra para confirmar en el Ligal mediante la técnica HPLC-MS/MS con el fin de identificar y cuantificar el antibiótico. Si el resultado de HPLC-MS/MS es inferior al límite de cuantificación de la técnica, se considera como negativo; si el resultado de la HPLC-MS/MS es superior al límite de cuantificación, pero inferior al LMR establecido para el antibiótico identificado, se considera como negativo, pero se informa a la Conselleria del Medio Rural. Si el resultado de HPLC-MS/MS es superior al LMR establecido para el antibiótico identificado, se considera positivo a quinolonas.

- c) En el caso de presencia de otros grupos de antibióticos diferentes a betalactámicos, tetraciclinas o quinolonas, el inspector realizará una toma de muestra a esta nueva leche, que será analizada en el Ligal mediante el test lento Delvotest.

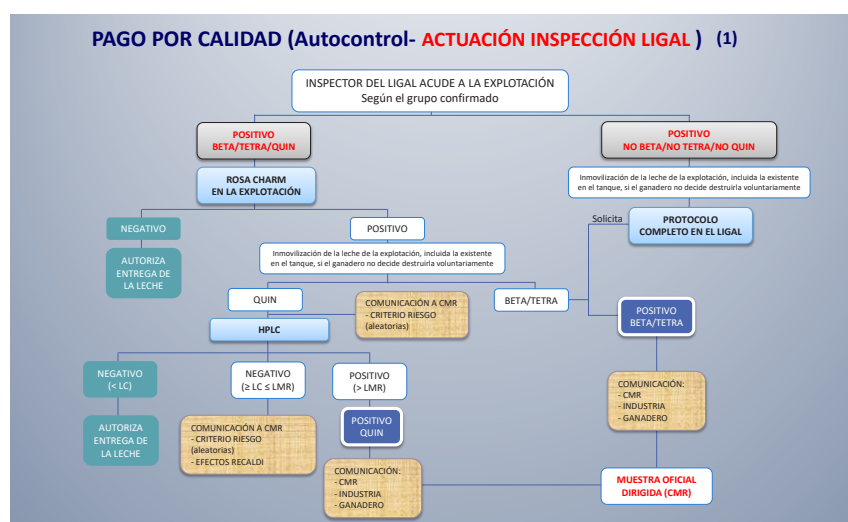
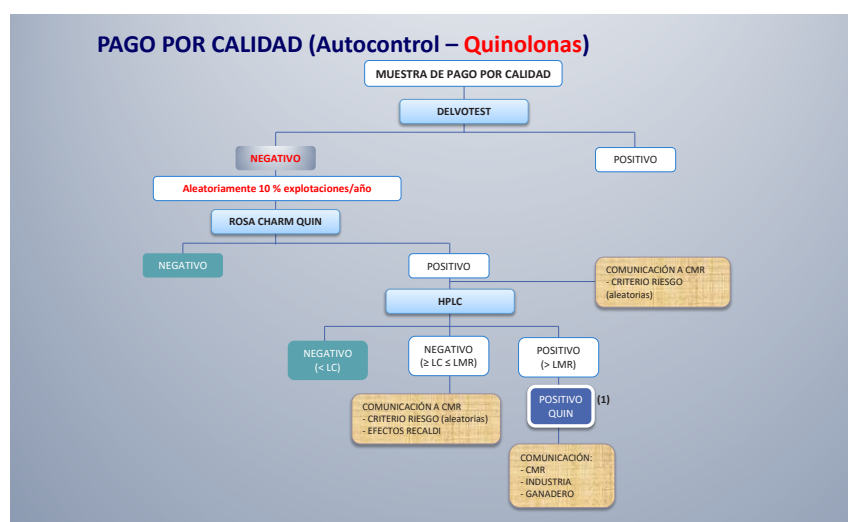
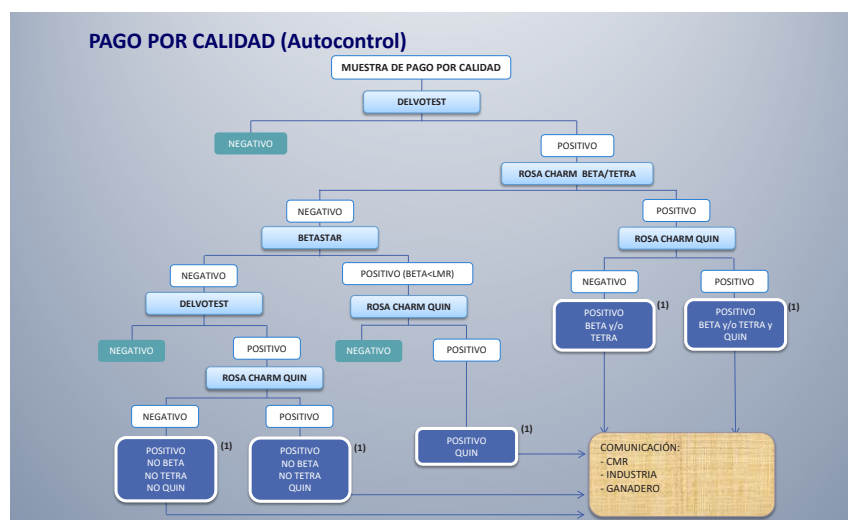
Si el resultado de la muestra de inspección es negativo, tanto *in situ* como en el Ligal, se autoriza la entrega de leche, pero se mantiene el incumplimiento correspondiente al resultado positivo obtenido en el test lento de la muestra anterior.

Si el resultado de la muestra de inspección es positivo, tanto *in situ* como en el Ligal, la Conselleria del Medio Rural se hace cargo del control posterior, procediendo a la toma de muestra oficial y entrando en marcha un procedimiento administrativo con la posible sanción posterior, en el caso de volver a dar positivo.

Tiempo medio de actuación ante un resultado con presencia de inhibidores

Los ensayos en el Ligal se hacen generalmente al día siguiente de la toma de la muestra que realiza el operador lácteo en la explotación, al igual que la visita de inspección a la explotación ganadera (siempre y cuando exista leche en el tanque); la actuación de la Conselleria del Medio Rural suele producirse dos días después de la toma de muestra realizada por el operador lácteo. ■

Esquemas del protocolo de inhibidores del Ligal



NOTA DE LA AUTORA

Elaboración propia en base al Real Decreto 1728/2007 y al Protocolo de inhibidores (Conselleria del Medio Rural-Ligal)